



HAL
open science

Fonction de la protéine VPS4 dans la sensibilité et la résistance au Watermelon mosaic virus (Potyvirus) chez le melon

Aimeric Agaoua

► To cite this version:

Aimeric Agaoua. Fonction de la protéine VPS4 dans la sensibilité et la résistance au Watermelon mosaic virus (Potyvirus) chez le melon. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2020. Français. NNT : 2020AVIG0721 . tel-03217747

HAL Id: tel-03217747

<https://theses.hal.science/tel-03217747>

Submitted on 5 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT D'AVIGNON UNIVERSITÉ

**École Doctorale N° 536
Sciences et Agrosociétés**

Agronomie et Virologie

**Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes
(GAFL)**

Présentée par
Aimeric Agaoua

**Fonction de la protéine VPS4 dans la sensibilité et la résistance au
Watermelon mosaic virus (Potyvirus) chez le melon**

Soutenue publiquement le 26/11/2020 devant le jury composé de :

Docteur Sylvie German-Retana, DR, Université de Bordeaux **Rapporteuse**

Docteur Robaglia Christophe, PR, Aix-Marseille Université **Rapporteur**

Docteur Desbiez Cecile, DR, Institut de Pathologie Végétale **Examinatrice**

Docteur Abdelhafid Bendahmane, DR, Institut des Sciences des Plantes de Paris-Saclay **Examineur**

Docteur Dogimont Catherine, DR, GAFL, **Directrice de thèse**

Docteur Moquet Frédéric, DR, Gautier Semences **Co-directeur de thèse**

Abstract

Cucurbitaceae are a family of plants represented by a great diversity of species and cultivated crops all around the world. Within this family and in the genus *Cucumis*, the melon is particularly susceptible to Potyviruses, against which no allele of the translation initiation factor *eIF4e* gene has been able to induce a resistance. In cucumber, also a *Cucurbitaceae* in the genus *Cucumis*, Amano *et al.* (2013) identified an allele of the gene encoding for the VPS4 protein, which is involved in the resistance to the Potyvirus *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). In the cell, the VPS4 protein belong to the ESCRT complex (Endosomal sorting complexes required for transport) and is involved in the membrane deformation at the endosome level to create multivesicular bodies (MVBs). The ESCRT complex is highly conserved in all eukaryotic organisms and well described in yeasts and mammals. The use of cell membranes by ssRNA(+) viruses through ESCRT and VPS4 has been widely described for viruses infecting animals, including Human Papillomavirus (HPV) and Human Immunodeficiency (HIV) viruses. In recent years, the major role of vesicular transport in viral infection has also been demonstrated in plants. ssRNA(+) viruses form vesicles and quasi-organelles using cell endomembrane, integrating viral replication complexes (VRCs) and all the elements necessary for the replication of viral RNA and for the translation of viral proteins.

This thesis focuses on two aspects: (1) the characterization of alleles of the *Vps4* gene involved in melon in a recessive resistance to the Potyvirus *Watermelon mosaic virus* (WMV) (2) and the study of the ESCRT involvement in the formation of viral vesicles in Potyvirus.

In the first objective, I demonstrated that a point mutation in the gene encoding the VPS4 protein induces resistance to WMV in the melon accession TGR-1551. For this, I used a virus transformed with the wild type allele of *Vps4* to infect the TGR-1551 accession. This allowed us to observe the restoration of the susceptibility in the resistant accession. In addition, all accessions from the natural diversity carrying this allele are also resistant to WMV. These results represent the first characterization of the molecular basis of resistance to WMV in melon. Combined with the results of Amano *et al.* (2013), this work is part of the identification of a gene for resistance to several Potyviruses.

In the second objective, I demonstrated the involvement of ESCRT in the replication of Potyviruses. Using a yeast two-hybrid approach adapted to transmembrane proteins, we showed the interaction of the viral protein 6K2 with the CmVPS28, CmVPS2, CmVPS24 and CmVPS4 melon proteins. In addition, we localized the 6K2 / VPS4 interaction at the viral vesicle level in the plant cell. Since ESCRT has been characterized only at the level of MVBs, the presence of VPS4 at the level of viral vesicles, especially at the level of chloroplasts, implies the hijack of the entire ESCRT mechanism by the virus.

Taken together, this work provides a better understanding of the viral vesicle formation mechanism during infection of a plant cell by a Potyvirus. It also offers the opportunity to identify new alleles providing resistance to Potyviruses in order to develop new resistant varieties.

Résumé

Les *Cucurbitaceae* sont une famille de plantes représentée par une grande diversité d'espèces et cultivées dans toutes les régions du monde. Le melon, qui appartient à cette famille et au genre *Cucumis*, est particulièrement sensible aux Potyvirus, vis-à-vis desquels aucun allèle du facteur d'initiation de la traduction *eIF4e* n'a permis d'induire de résistance. Chez le concombre, une *Cucurbitaceae* du genre *Cucumis*, Amano *et al.* (2013) ont identifié un allèle du gène codant pour la protéine VPS4 (Vacuolar protein sorting protein 4), impliqué dans la résistance au Potyvirus *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). Dans la cellule, la protéine VPS4 appartient au complexe ESCRT (Endosomal sorting complexes required for transport) et est impliquée dans la déformation des membranes au niveau des endosomes pour former les corps multivésiculaires (MVBs). L'ESCRT est fortement conservée chez tous les organismes eucaryotes et bien décrite chez les levures et les mammifères. L'utilisation des membranes cellulaires par les virus à ARNs(+) par le biais de l'ESCRT et de VPS4 est largement décrite pour les virus infectant les animaux, notamment pour les virus du papillome humain (VPH) et de l'immunodéficience humaine (VIH). Ces dernières années, le rôle majeur du transport vésiculaire dans l'infection virale a également été mis en évidence chez les plantes. Les virus à ARNs(+) forment des vésicules et des quasi-organites, en intégrant les complexes de réplication viraux (VRCs) et tous les éléments nécessaires à la réplication de l'ARN viral et à la traduction des protéines virales.

Cette thèse se concentre sur deux aspects : (1) la caractérisation d'allèles du gène *Vps4* impliqués dans la résistance récessive au Potyvirus *Watermelon mosaic virus* (WMV) chez le melon (2) et l'étude du rôle de l'ESCRT dans la formation des vésicules virales chez les Potyvirus.

Dans le premier objectif, j'ai montré qu'une mutation ponctuelle sur le gène codant pour la protéine VPS4 induit la résistance au WMV chez l'accession de melon TGR-1551. Pour cela, j'ai utilisé un virus transformé avec l'allèle sauvage pour infecter l'accession TGR-1551. Cela a permis d'observer la restauration de la sensibilité chez l'accession résistante. De plus, l'ensemble des accessions portant cet allèle sont également résistantes au WMV. Ces résultats représentent la première caractérisation des bases moléculaires d'une résistance au WMV chez le melon. Associés aux résultats de Amano *et al.*, (2013), ces travaux contribuent à l'identification d'un gène de résistance à plusieurs Potyvirus.

Dans le second objectif, j'ai montré l'implication de l'ESCRT dans la réplication des Potyvirus. Par une approche de double hybride associée aux protéines transmembranaires, nous avons montré l'interaction de la protéine virale 6K2 avec les protéines CmVPS28, CmVPS2, CmVPS24 et CmVPS4 du melon. De plus, nous avons localisé l'interaction 6K2/VPS4 au niveau des vésicules virales dans la cellule de plante. L'ESCRT ayant été caractérisée uniquement au niveau des MVBs, la présence de VPS4 au niveau des vésicules virales, en particulier au niveau des chloroplastes, implique le détournement de l'ensemble du mécanisme ESCRT par le virus.

Pris ensemble, ces travaux contribuent à une meilleure compréhension du mécanisme de formation des vésicules virales au cours d'une infection d'une cellule de plante par un Potyvirus. Ils offrent également l'opportunité d'identifier de nouveaux allèles apportant une résistance aux Potyvirus afin de développer de nouvelles variétés résistantes.

Remerciements

Ma gratitude revient dans un premier temps à mes superviseurs, le docteur Dogimont Catherine et le docteur Moquet Frédéric, qui m'ont donné l'opportunité de poursuivre mes études en doctorat. Je les remercie pour leurs conseils, soutiens et enseignements durant cette période. Leurs présences ont été essentielles pour ces 3 années de travail.

Merci aux structures, Gautier Semences et INRAE, qui ont permis l'accueil et le financement de ce projet.

Je voudrais remercier les docteurs Sylvie German-Renata, Abdelhafid Bendahmane et Clémence Plissonneau pour le temps accordé à ce projet qui a été essentiel à la réussite des approches réalisées.

Merci à tous les chercheurs, ingénieurs et techniciens de l'unité du GAFL et de Pathologie Végétale pour leur aide scientifique et technique. Et particulièrement aux docteurs Desbiez Cécile et Jean-Luc Gallois.

Je tiens à témoigner de ma profonde gratitude à Vérane Sarnette, Vincent Rittener et Luc Sofer qui ont permis la réalisation de l'ensemble des travaux en serre et en laboratoire réalisé au GAFL et à Bordeaux de ce projet.

Je remercie également les personnes qui, dans mon parcours d'étudiant, ont joué un rôle majeur dans mes choix d'orientation :

Le docteur Robaglia Christophe, enseignant-chercheur à l'université d'Aix-Marseille en charge du Master MBVB dont j'ai obtenu le diplôme en 2016, et de tous les enseignants-chercheurs qui sont intervenues, qui ont su me transmettre leurs connaissances et leur passion de la recherche scientifique.

Le docteur et ami Colcombet Jean, chercheur à l'IP2S, qui m'a accordé sa confiance pour effectuer mon stage de fin d'études dans son équipe, et dans laquelle j'ai découvert l'univers de la recherche.

Enfin, je voudrais remercier ma famille. Je remercie mes parents, Marie-Pierre et Karim, pour tout. Je remercie mon frère Dimitri, Nicole, Audrey et Elias. Merci à mes tantes, oncles, cousin et cousines qu'ils soient à quelques pas ou à l'autre bout du monde.

Je tiens à remercier celle qui partage ma vie, Laëtitia, qui m'a soutenu en chaque instant.

Enfin, je remercie le groupe des doctorants, Pierre, Zoe, Isidore, Delyan, Stéphanie, Estelle, Séverine, Anna et les autres. Tous les collègues de café, de babyfoot, de lasergame et d'escape game.

Sommaire

LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLES	19
LISTE DES ABREVIATIONS	21
CHAPITRE I – INTRODUCTION GENERALE	23
<i>Les Cucurbitaceae</i>	27
Le melon	27
Les virus infectant les Cucurbitaceae	31
La résistance génétique aux virus chez les végétaux	33
Les résistances génétiques aux virus identifiées chez le melon	35
Cycle de réplication du génome des virus ARNs ^b (+)	37
Les Potyvirus et l'organisation de leur génome	41
Les protéines virales associées à la réplication RdRp, VPg-Pro et CI	43
Les protéines transmembranaires 6K2 et 6K1	45
Protéines virales associées au mouvement : P3N-PIPO, HC-Pro et CP	45
Les protéines P1 et P3	49
Les voies de transport cellulaires	51
Formation et fusion des vésicules externes	53
Formation des vésicules internes	55
Association des membranes intracellulaire de l'hôte avec les complexes de réplication viraux chez les Potyvirus	59
Association des membranes intracellulaire de l'hôte avec les complexes de réplication viraux chez les autres virus à ARNs ^b (+)	63
Objectifs de la thèse	69

CHAPITRE II – CARACTERISATION D’UN ALLELE DE VPS4 APPORTANT LA RESISTANCE AU WMV CHEZ LE MELON	87
Introduction	89
Matériels et Méthodes	93
Résultats	105
VPS4 est conservée chez les eucaryotes	105
Aucune diversité n’a été trouvée dans le domaine MIT chez Arabidopsis et la tomate	109
Le séquençage du domaine MIT de VPS4 chez le melon révèle de la diversité	111
Les substitutions sur <i>CmVps4</i> ^{P30R} , <i>CmVps4</i> ^{P30S} et <i>CmVps4</i> ^{K40R} modifient l'encombrement stérique du domaine MIT	113
Les allèles <i>CmVps4</i> ^{P30R} , <i>CmVps4</i> ^{P30R} et <i>CmVps4</i> ^{K40R} chez le melon n’induisent pas de résistance au ZYMV	117
Les accessions portant l’allèle <i>Vps4</i> ^{P30R} et <i>Vps4</i> ^{K40R} sont résistantes au WMV	119
Le crible d’une collection EMS de melon pour le gène <i>Vps4</i> ne présente pas de diversité sur le domaine MIT	123
Les familles EMS portant une substitution non-synonyme sur le gène <i>CmVps4</i> ne sont pas résistantes au ZYMV et au WMV	125
Les vecteurs viraux WMV-LLA10- <i>CmVps4</i> ^{wt} et le WMV-LLA10- <i>CmVps4</i> ^{P30R} sont infectieux.....	127
TGR-1551 présente une forte charge virale après inoculation avec la souche WMV-LLA10- <i>CmVps4</i> ^{P30R}	129
Discussion.....	131
CHAPITRE III – IDENTIFICATION DES INTERACTIONS ENTRE LA PROTEINE 6K2 ET LES PROTEINE DE L’ESCRT	153
Introduction	155
Matériels et Méthodes	159

Résultats	165
Mise au point de l'approche SU-Y2H et validation des constructions appâts	165
Sélection des gènes de l'ESCRT	169
Interaction de 6K2 du WMV avec les protéines de l'ESCRT	171
Validation de l'interaction entre les protéines CmVPS4 et 6K2 du WMV	173
Discussion	177
CHAPITRE IV – DISCUSSION GENERALE	187
Aperçu	189
L'ESCRT et les vésicules virales	193
L'ESCRT dans la résistance aux Potyvirus	199
Perspectives	201
Figures et tables supplémentaires	213

Liste des Figures

Figure 1 : Exemple de diversité chez le melon	28
Figure 2 : Symptômes causés par certains virus sur les Cucurbitacées	32
Figure 3 : Représentation schématique de la résistance dominante et récessive dans un pathosystème plante-virus	34
Figure 4 : Représentation schématique du cycle d'infection des virus à ARNs(+) de plantes	38
Figure 5 : Structure du virion et du génome des Potyvirus	42
Figure 6 : Voies de transport vésiculaire par les protéines COPI/COPII	52
Figure 7 : Fusion des vésicules médiées par les protéines SNAREs	54
Figure 8 : Illustration de la biogenèse et de l'adressage des corps multivésiculaires (MVBs)	56
Figure 9 : Bourgeonnement vésiculaire médié par l'ESCRT	56
Figure 10 : Carte des principaux composants de la biogenèse des corps multivésiculaires.	58
Figure 11 : Modèle pour la formation de vésicules induites par le virus sur le réticulum endoplasmique (ER)	60
Figure 12 : Micrographies électroniques à transmission de chloroplastes anormalement déformés contenant des vésicules liées à la membrane dans des feuilles infectées par le TuMV	60
Figure 13 : Le TuMV acquiert une enveloppe en détournant le tonoplaste	62
Figure 14 : Vésicules extracellulaires présentes dans l'espace intercellulaire des feuilles infectées par TuMV	64
Figure 15 : Vésicules virales induites par le <i>Tomato bushy stunt virus</i> et le <i>Carnation italian ringspot virus</i>	66
Figure 16 : Vésicules virales induites lors de l'infection du <i>Brome mosaïc virus</i>	66
Figure 17 : Echelle de notations des symptômes viraux	96

Figure 18 : Arbre phylogénétique de la séquence protéique VPS4 de différentes espèces	106
Figure 19 : Exposition structurale des acides aminés du domaine MIT de CmVPS4	114
Figure 20 : Modélisation de la structure du domaine MIT du melon	116
Figure 21 : Symptômes présentés après infection par le ZYMV chez des accessions de melon portant différents allèles de <i>CmVPS4</i>	118
Figure 22 : Tests de résistance au WMV pour les melons portant l'allèle <i>CmVps4</i>^{P30R}	120
Figure 23 : Test de résistance au WMV pour les accessions de melons portant l'allèle <i>CmVps4</i>^{K40R}	122
Figure 24 : Représentation de la disposition des substitutions naturelles et des mutations induites sur la protéine VPS4 du melon	124
Figure 25 : Symptômes présentés par différentes familles de melon mutagénisées à l'EMS, homozygotes pour les mutations dans le gène <i>CmVps4</i>	126
Figure 26 : Accumulation virale dans la famille CmEMS P223S en ségrégation pour l'allèle <i>CmVps4</i> P223S après inoculation au WMV	128
Figure 27 : Accumulation virale des souches de WMV transformées avec le gène <i>CmVps4</i> dans Charentais Monoïque	130
Figure 28 : Accumulation virale des souches de WMV transformées avec le gène <i>CmVps4</i> dans TGR-1551	132
Figure 29 : Représentation des constructions appâts adaptées au double hybride dans la levure en split-ubiquitine (SU-Y2H)	166
Figure 30 : Validation des constructions appâts	168
Figure 31 : Contrôle négatif du système BiFC	174
Figure 32 : Evaluation du niveau d'émission de la protéine YFP	174
Figure 33 : Localisation de l'interaction VPS4/6K2 dans la cellule de plante.....	176
Figure 34 : Modèle du mouvement des vésicules induites lors de l'infection d'une cellule de plante par le TuMV	196

Liste des tables

Table 1 : Conservation des domaines de la protéine VPS4 comparé à <i>A. thaliana</i>	108
Table 2 : Liste des allèles du gène <i>Vps4</i> issue de la collection du melon	112
Table 3 : Gènes homologues de l'ESCRT chez <i>Arabidopsis thaliana</i> et le melon	170
Table 4 : Crible d'interactions entre la protéine 6K2 du WMV et les protéines de l'ESCRT du melon	172

Liste des Abréviations

ARNsb(+)	ARN simple brin de sens positif
BiFC	Bimolecular fluorescence
BMV	<i>Brome Mosaic Virus</i>
CIRV	<i>Carnation Italian ringspot virus</i>
CM	Charentais Monoïque
CMV	Cucumber mosaic virus
CNV	<i>Cucumber Necrosis Virus</i>
COP I/II	Coated protein complex I/II
EMS	Ethylmethylsulphonate
ER	Réticulum endoplasmique
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport
ETI	Effector-triggered immunity
GA	Appareil de golgi
GFP	Green fluorescent protein
HPV	virus humain du papillomavirus
ILV	Intra-luminal vesicle
KO	Knock-out
MIT	Mitogen associated protein domain
MVB	Corps multivésiculaires
MWMV	Marrocan watermelon mosaic virus
ORF	Open reading frame
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
pER	Peroxisome dérivé du réticulum endoplasmique
PRSV	<i>Papaya ringspot virus</i>
PTI	Pathogen-triggered immunity
RFP	Red fluorescent protein
SNARE	N-ethylmaleimide-Sensitive-factor Attachment protein Receptor
SU-Y2H	Split-ubiquitine Yeast two hybrids
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TILLING	Targeting Induced Local Lesions in Genomes
TuMV	Turnip mosaic virus
UTR	Untranslated region
VRC	Complexe de réplication virale
WMV	Watermelon mosaic virus
Wt	Wild type
YFP	Yellow fluorescent protein
ZYMV	Zucchini yellow mosaic virus

A ma mère,

CHAPITRE I – INTRODUCTION GENERALE

L'être humain a commencé à cultiver les plantes il y a 10 000 ans pour son alimentation [1]. En choisissant les plantes les plus intéressantes en fonction de leur phénotype (nombre et taille des fruits, nombre de graines, vitesse de croissance, ...) pour les ressemer, les premiers agriculteurs ont réalisé, sans le savoir, de la sélection génétique. Ainsi, les premières plantes cultivées sont progressivement passées de l'état sauvage à l'état cultivé [2]. Ces variétés cultivées ont, au fil de siècles de sélection, produit des fruits de plus en plus gros, plus nutritifs, avec plus de graines, avec un développement plus rapide et en améliorant leur tolérance à l'environnement et aux maladies. La sélection classique a été le principal facteur d'amélioration des cultures jusqu'à l'arrivée de la révolution verte au milieu du XXe siècle. Les progrès de la mécanisation (tracteurs, moissonneuses, ...) et de l'industrie chimique (herbicides, insecticides, engrais chimique, ...) ont permis une augmentation radicale de la production [3,4]. Aujourd'hui, de nouveaux défis attendent l'agriculture mondiale. Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO; www.fao.org), d'ici 2050, la population mondiale atteindra 9 milliards d'habitants. Pour nourrir toute cette population, la production alimentaire devra augmenter de 70%. Deux difficultés majeures s'ajoutent à cet objectif : (1) Les modifications rapides de l'environnement causées par le réchauffement climatique, risquant d'augmenter l'amplitude des événements climatiques extrêmes et la récurrence des épidémies. (2) Les avancées issues de la révolution verte sont fortement remises en cause, notamment celles issues de l'industrie chimique. L'utilisation des intrants chimiques sur le long terme et en excès tels que les insecticides s'est révélée nocive pour l'environnement et la santé humaine [4,5].

La solution qui sera apportée devra permettre la limitation, voir la complète suppression, des intrants chimiques. L'une des méthodes mise en avant est la sélection « moderne ». A l'aide des outils de séquençage et de biologie moléculaire développés à partir du début du XX^e siècle, la sélection peut se faire sur des aspects génétiques. Cela permet d'augmenter considérablement la vitesse d'identification des traits d'intérêt et de réduire le temps nécessaire à l'introgession de ces traits dans des variétés cultivées [6,7].

Les conditions de croissance optimales sont spécifiques à chaque espèce végétale et les écarts par rapport à ces optima constituent des contraintes. La première classe de stress est représentée par un environnement non vivant (stress abiotiques) comme la sécheresse, la salinité, la disponibilité des nutriments ou encore la température. La deuxième classe de stress est représentée par des organismes vivants (stress biotiques) comme les animaux, les insectes, les bactéries, les champignons et les virus [8,9]. Des variations génétiques présentes dans des variétés non cultivées, qui ont évolué sur de nombreuses générations dans leur environnement pour mieux tolérer l'ensemble des stress présent, sont une source de traits d'intérêt pour la sélection [10].

L'un des principaux objectifs de notre groupe de recherche est l'identification et la caractérisation de nouvelles résistances génétiques aux maladies virales chez les plantes cultivées.

Les Cucurbitaceae

L'ordre des Cucurbitales est composé de quatre familles : les *Begoniaceae*, les *Cucurbitaceae*, les *Datisceae* et les *Tetramelaceae*. Les *Cucurbitaceae* sont la deuxième plus grande famille de l'ordre des Cucurbitales. Les plantes de cette famille sont représentées par plus de 115 genres et 900 espèces. Elles ont un développement végétatif très similaire. Cependant, leurs fruits présentent une grande diversité dans leur forme, taille, couleurs et autres caractéristiques, résultant d'une variété d'utilisations. Ils sont également très utiles dans la classification des espèces et variétés de Cucurbitacées [11–14]. Les Cucurbitaceae sont principalement cultivées pour la production alimentaire sous forme de fruits mûrs, de graines ou de fleurs, mais aussi à des fins utilitaires et décoratives [11,15]. Cette famille de plantes représente la culture maraîchère la plus importante économiquement après celle des Solanacées. La production de la plupart des plantes cultivées de cette famille a doublé au cours des 25 dernières années, ce qui a retenu l'attention des sélectionneurs de plantes. Au niveau mondial, la production de pastèque (*Citrullus lanatus*) a atteint 100 millions de tonnes, les concombres (*Cucumis sativus*) 75 millions de tonnes, le melon (*Cucumis melo*) 27 millions de tonnes et les citrouilles et courges (*Cucurbita pepo* et *Cucurbita maxima*) 27 millions de tonnes (FAOSTAT 2018).

Le melon

Le centre de ressource génétique de légumes (CRBLeg) de l'INRAE situé à Montfavet possède une collection de ressources génétiques de melon. Cette collection est constituée d'accessions sauvages et cultivées originaire de toutes les régions du monde. Le melon (*Cucumis melo*) appartient à la famille des *Cucurbitaceae* et au genre *Cucumis*, qui comprend également le concombre (*Cucumis sativus*), une autre culture importante de Cucurbitacées. L'origine du melon cultivé par l'homme reste incertaine en raison de la grande diversité des régions cultivant cette espèce depuis plusieurs millénaires et la coexistence de melons sauvages et cultivés dans différentes régions du monde, encore de nos jours. Les premières représentations de melon cultivé remontent à la Chine en l'an 3000 avant JC, en Inde en l'an 2000 avant JC et en Egypte en l'an 1500 avant JC.

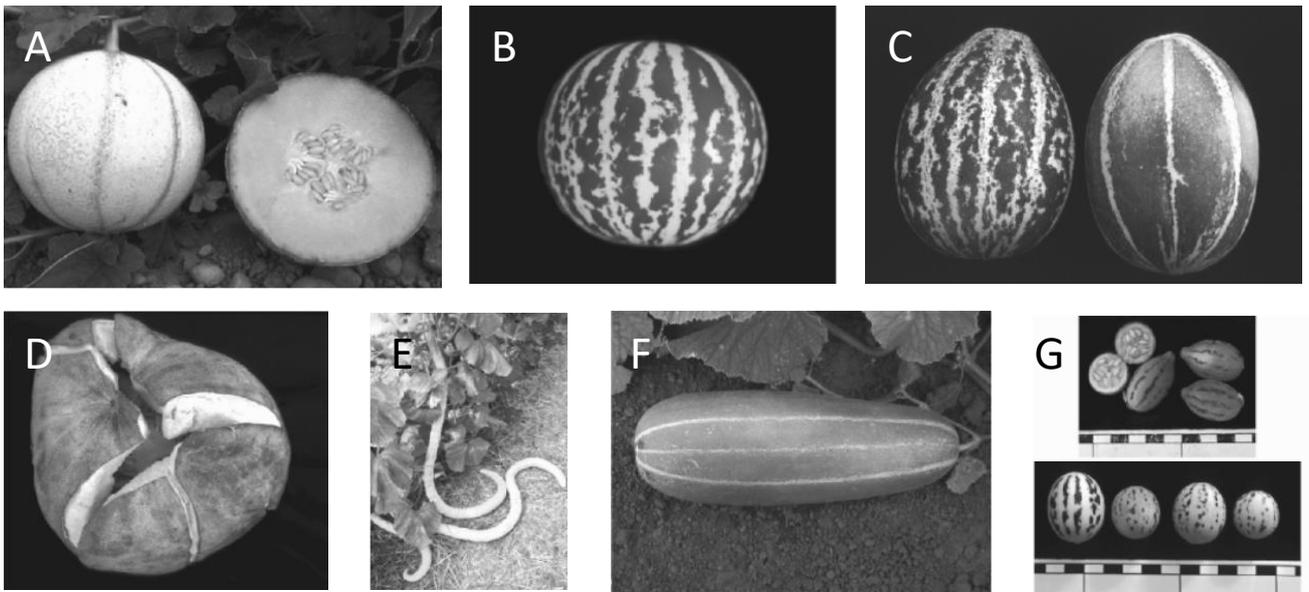


Figure 1 : Exemple de diversité chez le melon.

(A) *var. cantalupensis* cultigroup Charentais. (B) *var. dudaim*. (C) *var. tibish*. (D) *var. momordica*. (E) *var. flexuosus*. (F) *var. conomon*. (G) Fruits de melons sauvages. **M. Pitrat, 2007. Melon [16].**

Des données récentes de séquençage de plus de 1000 accessions de melon du monde entier suggèrent trois domestications distinctes, l'une en Afrique de l'Est et les deux autres en Asie, vraisemblablement en Inde [17]. De nos jours, les melons sont principalement récoltés comme fruits mûrs pour leur forte teneur en sucre. Les méthodes de sélection conventionnelles ont conduit à une large diversité variétale (figure 1) [16,18].

Au niveau génétique, le melon est une plante diploïde ($2n = 24$). Le séquençage du génome du melon a été publié en 2012 en utilisant la lignée double haploïde DHL92 [19]. Ce séquençage couvre 83% de la longueur du génome estimée à 450 Mpb et permet la prédiction de 27 427 gènes codant. Des données de reséquençages sur plus de 1000 accessions ont été publiées depuis afin d'étudier la diversité génétique et les sources de résistances [20]. Des outils génomiques existent pour le melon et la biotechnologie végétale peut être utilisée pour introduire des gènes et transférer de nouvelles caractéristiques pour la sélection ou la validation fonctionnelle de gènes candidats impliqués dans des traits d'intérêt horticoles. La transformation par le biais d'*Agrobacterium tumefaciens* requière un protocole approprié et la disponibilité d'un système fiable de régénération des plantes. La première publication de transformation réussie du melon date de 1990 [21]. Depuis, plus de 40 protocoles de régénération de melon *in vitro* ont été décrits sur différents cultivars de melon [22–26]. Cependant, le melon est largement considéré comme une espèce récalcitrante pour la transformation génétique. Plusieurs facteurs biologiques et physiques affectent le taux d'efficacité et la régénération du melon qui rend la transformation difficile et dépendante du génotype [27–29]. Lors de la régénération des plantules, des anomalies morphologiques sont fréquentes. Il a été observé la présence de protubérances méristématiques qui ne se développent pas en pousses ou plantules normales sans dominance apicale [30,31] et la fréquence élevée des régénérants tétraploïdes [28,32]. La capacité de transformation varie considérablement selon le cultivar et les explants cibles. Des régénérants faux positifs sont généralement obtenus [33]. Même si des résultats ont été rapportés avec des génotypes particuliers [34,35], l'efficacité de la transformation reste relativement faible, et généralement comprise entre 0,7% et 3% [23,25,36–38].

L'approche TILLING est une approche alternative qui a été développée très tôt chez le melon [39,40]. Des collections de mutants EMS de melon ont été constituées dans le cadre d'une collaboration entre INRAE (GAFL et IPS2) et 3 partenaires privés (ASL, Gautier Semences et Takii) [40]. Ces collections et l'identification de mutants par TILLING ont permis la validation fonctionnelle de gènes impliqués dans différents caractères du melon, en particulier des gènes du déterminisme du sexe [41–44].

Les virus infectant les Cucurbitaceae

Les virus végétaux sont considérés comme responsables de la moitié des maladies infectieuses émergentes chez les plantes [45]. Il a été caractérisé au moins 70 virus pouvant infecter les *Cucurbitaceae* à travers le monde. Les principaux genres de virus identifiés infectant les *Cucurbitaceae* sont les *Cucumovirus*, *Potyvirus*, *Polerovirus*, *Crinivirus*, *Ipomovirus*, *Begomovirus*, *Comovirus*, *Tospovirus*, *Carmovirus* et *Tobamovirus* [46–48]. Il y a eu de nombreuses observations sur les pertes de récoltes dans les plantations agricoles suite à une infection naturelle, ou dans des essais expérimentaux dans lesquels les plantes sont infectées dès le début ou à différents stades de croissance des cultures [49–52]. Certains de ces virus sont répandus, causant des pertes majeures de rendement, tandis que d'autres restent limités à des régions géographiques limitées ou à des systèmes de culture spécifiques où ils ont une incidence économique mineure [53] (Figure 2). En plus de la réduction de la croissance des plantes, les symptômes viraux typiques des cucurbitacées sont classifiés dans trois grandes catégories [54] :

- Présence de mosaïques sur les feuilles parfois associées à une réduction de la taille des feuilles et la présence de cloques ou d'énations ; les fruits peuvent développer des décolorations et des déformations altérant leur qualité.
- Un jaunissement des feuilles âgées et matures ; la production de fruits possiblement réduite mais la qualité des fruits n'est généralement pas affectée.
- Nécrose soit sous forme de taches nécrotiques sur les feuilles, soit sous forme généralisée ou de flétrissement.

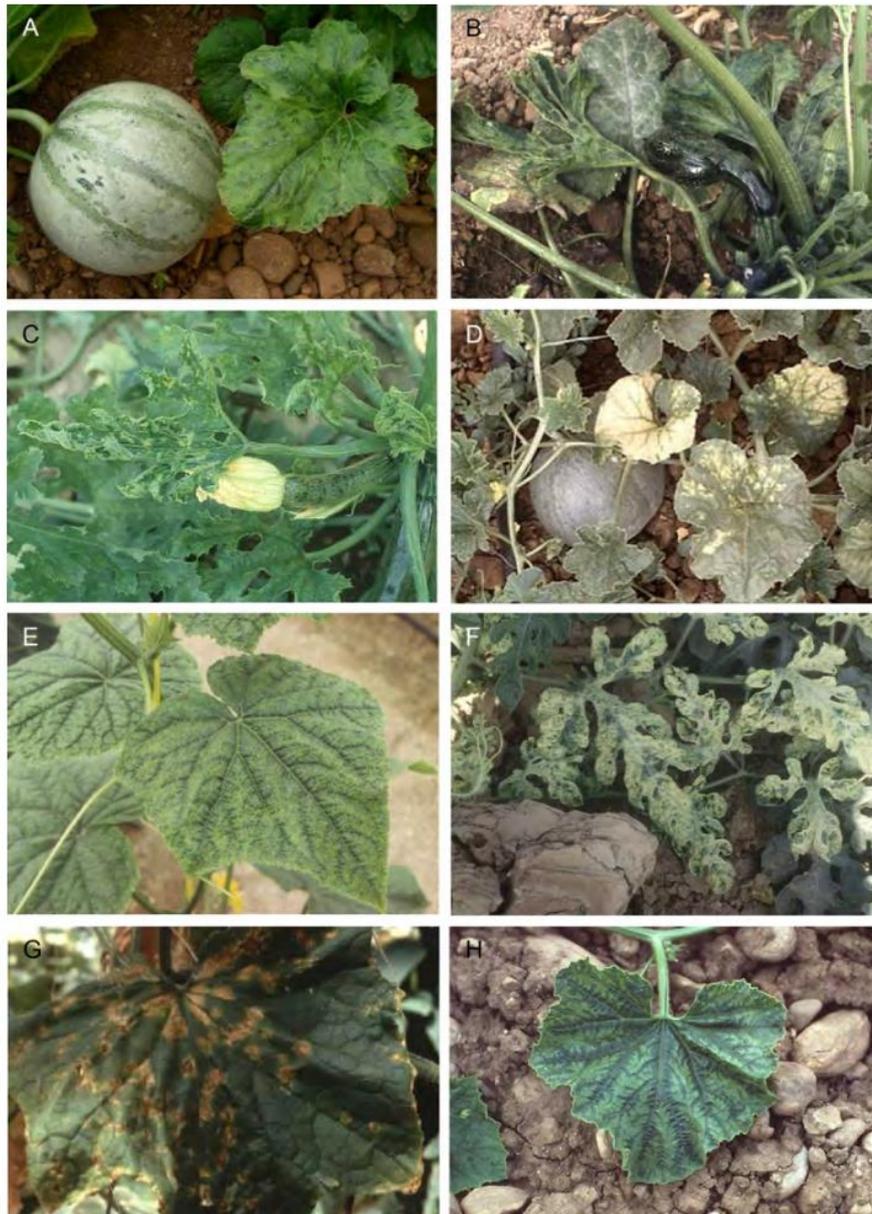


Figure 2 : Symptômes causés par certains virus sur les Cucurbitacées.

(A) Mosaïque sur une feuille et un fruit d'une plante de melon infectée par le Watermelon mosaic virus (WMV); (B) Mosaïque sévère et déformation sur les feuilles et les fruits d'une plante de courgette infectée par le Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV); (C) Mosaïque et déformation sur les feuilles et les jeunes fruits d'une plante de courgette infectée par le Cucumber mosaic virus (CMV); (D) jaunissement des feuilles plus anciennes d'une plante de melon infectée par le Cucurbit aphib-borne yellows virus (CABYV) ; (E) Chlorose autour des veines sur une feuille d'une plante de concombre infectée par le Cucumber vein yellowing virus (CVYV); (F) Mosaïque jaune sévère sur une plante de pastèque infectée par le Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV); (G) Taches nécrotiques sur une feuille d'une plante de concombre infectée par le Muskmelon necrotic spot virus (MNSV); et (H) Chlorose sur une feuille d'un plant de melon infecté par le Squash mosaic virus (SqMV). **Hervé Lecoq et Cécile Desbiez, 2012. Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region: An Ever-Changing Picture [48].**

Les virus sont principalement transmis par le biais d'insectes vecteurs tel que les pucerons, les aleurodes et les thrips. Dans certains cas, il a été reporté des transmissions par champignons, par les graines ou par contact direct entre plantes infectées [55–58].

La résistance génétique aux virus chez les végétaux

Les virus sont des parasites obligatoires qui utilisent les ressources cellulaires dans toutes les étapes de leur cycle de réplication. Au cours du processus d'infection, les facteurs viraux interagissent avec les facteurs de l'hôte.

Les plantes, contrairement aux mammifères n'ont pas de système immunitaire adaptatif. Au lieu de cela, elles s'appuient sur l'immunité innée de chaque cellule et sur les signaux systémiques émanant des organismes infectieux (PAMPs) [59]. La reconnaissance des PAMPs par la plante induit l'immunité appelée PTI (Pathogen-triggered immunity), induisant l'expression d'un ensemble de réponses destinées à résister à une attaque de pathogène [60]. La perception des agents pathogènes peut également se produire via la reconnaissance d'effecteurs, qui sont des molécules synthétisées par les pathogènes et délivrées dans le milieu extracellulaire ou dans la cellule végétale pour améliorer leur capacité infectieuse, par exemple, en neutralisant l'induction du PTI [60,61].

Un second niveau de défense immunitaire intervient chez la plante peut intervenir, le système immunitaire ETI (Effector-triggered immunity). Ce dernier peut s'activer sous deux conditions : (1) Lors d'une interaction directe avec un effecteur viral. (2) Ou de manière indirecte en détectant le produit de l'action d'un effecteur virale, tel que l'inhibition d'une voie de signalisation du PTI. Les gènes impliqués dans l'activation de l'ETI codent généralement pour des protéines NBS-LRR [62–64]. Si le gène codant pour une protéine NBS-LRR est absent ou inactif, le système immunitaire ne se déclenche pas et la plante est infectée. Dans ces deux cas, la présence d'un seul allèle d'un gène R codant pour une NBS-LRR, capable de détecter le pathogène est suffisant pour induire une immunité. On parle ainsi de résistance dominante [65].

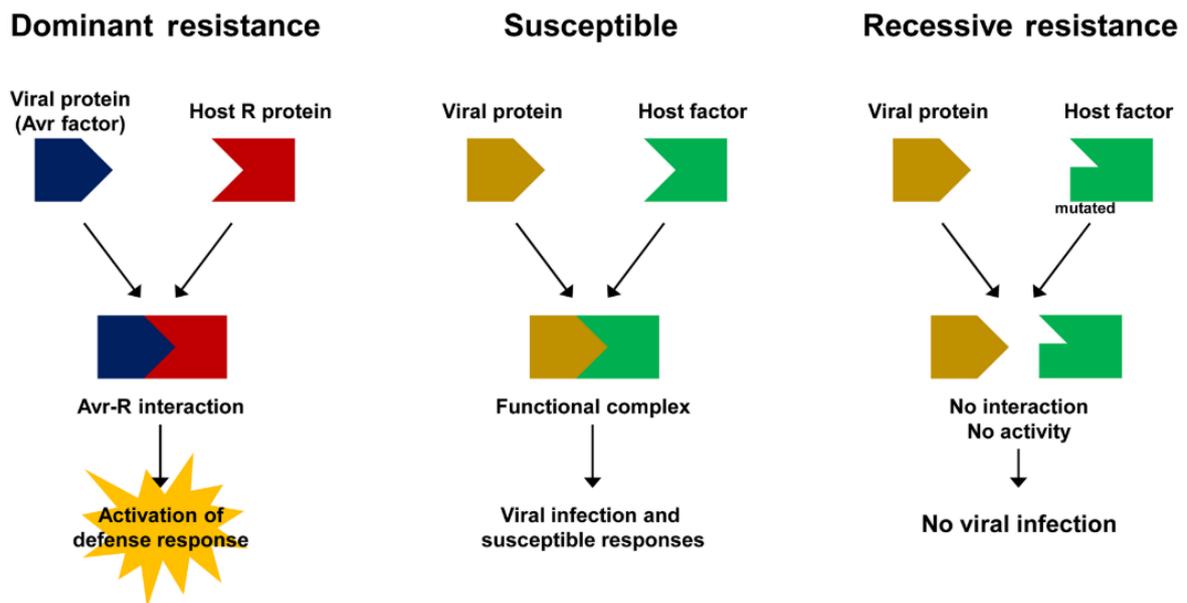


Figure 3 : Représentation schématique de la résistance dominante et récessive dans un pathosystème plante-virus.

Une protéine codée par un virus peut agir comme un facteur d'avirulence qui est reconnu par une protéine de résistance (R) codée par l'hôte. L'interaction entre un facteur d'avirulence viral et une protéine R de l'hôte déclenche des réponses de défense en aval, entraînant l'activation de la résistance dominante. Les virus végétaux sont des parasites obligatoires et nécessitent diverses protéines codées par l'hôte (facteurs de l'hôte) pour terminer les étapes de leur cycle de vie. Par conséquent, l'absence de facteurs hôtes appropriés ou l'inhibition des interactions entre les protéines virales et les facteurs hôtes correspondants peuvent conférer une résistance récessive. **Soo-Jung Han et al., 2019. Recessive Resistance: Developing Targets for Genome Editing to Engineer Viral Disease Resistant Crops [66].**

Lors de l'infection, les protéines virales recrutent de nombreux facteurs de l'hôte pour assurer la réplication du virus. Ces facteurs hôtes sont des protéines exprimées par la cellule, exerçant diverses fonctions et permettant aux mécanismes cellulaires de fonctionner [67]. Ils se différencient des protéines dites NBS-LRR dont la seule fonction est de reconnaître les agents pathogènes.

L'absence ou la modification de structure d'un ou de plusieurs de ces facteurs chez l'hôte entraîne une absence d'infection, une réplication réduite du virus ou un mouvement ralenti, résultant d'une faible accumulation de virus et des symptômes faibles chez les plantes infectées. Ces facteurs sont responsables de la sensibilité de l'hôte à l'infection. L'absence ou la modification de la structure protéique codée par un gène de sensibilité ne permet plus au facteur viral d'interagir avec elle, empêchant le virus de compléter son cycle de réplication. L'absence du facteur de sensibilité implique que la modification soit, au niveau génétique, présente à l'état homozygote, on parle dans ce cas de résistance récessive [66–68].

Les résistances génétiques aux virus identifiées chez le melon

Des sources de résistance à plusieurs virus ont été décrites et leur hérédité a été étudiée dans de nombreux cas [16,69]. Les sources de résistance se trouvent principalement dans des accessions originaires d'Inde (PI 414723, PI 180280, PI 180283, PI 124112, PI 313970...) mais aussi d'Extrême-Orient (PI 161375, Freeman's cucumber) ou du Zimbabwe (TGR 1551). Les gènes impliqués dans ces résistances ont été identifiés pour certains d'entre eux, d'autres restent à identifier [70–72].

Jusqu'à présent, peu de cultivars améliorés résistants aux virus ont été publiés. De plus, des infections virales mixtes étant souvent observées dans une culture de melon, le pyramidage de résistance à plusieurs virus est nécessaire pour la construction de systèmes de cultures durables [73].

Cycle de réplication du génome des virus ARNsb(+)

Les virus du groupe IV, virus à ARN simple brin de sens positif (ARNsb(+)) constituent le plus grand groupe de virus infectant les végétaux. Ces virus ont de petits génomes qui codent un nombre limité de protéines et comme tout virus, ils dépendent de leurs hôtes pour compléter les différentes étapes de leur cycle de réplication. Tous les virus à ARNsb(+) doivent accomplir des étapes de base similaires pour répliquer leurs génomes (figure 4) [74,75].

La première étape est la synthèse des protéines de réplication virale. Le génome de l'ARN simple brin est de polarité positive, ce qui signifie qu'il peut agir comme un ARN messenger (ARNm) immédiatement après le retrait de la capsid virale [76]. Comme le génome des virus ne codent pas pour les facteurs de traduction ou pour les ribosomes, ils doivent utiliser le mécanisme de traduction de l'hôte pour effectuer cette étape. L'étape suivante est l'assemblage du complexe de réplication virale (VRC), qui est associé aux membranes intracellulaires. Le complexe VRC contient des protéines virales, des protéines de l'hôte et l'ARN viral. L'ARN viral sert à la fois d'ARNm pour la traduction et de modèle pour la réplication, ainsi la traduction et la réplication sont souvent étroitement liées. L'association des VRC avec les membranes intracellulaires est commune à tous les virus à ARNsb(+) caractérisés à ce jour [77]. Cette association entraîne la formation de vésicules ou sphérules membranaires qui constituent des compartiments subcellulaires, dans lesquels les protéines de réplication et les ARN viraux sont séquestrés et isolés du contenu cytoplasmique de la cellule. Ainsi, la formation de ce compartiment peut jouer un rôle protecteur contre la dégradation des ARN viraux. Il a également été démontré que les membranes jouent un rôle actif dans la réplication virale, et la modification de la composition lipidique des membranes intracellulaires entraîne une diminution de la réplication virale [78].

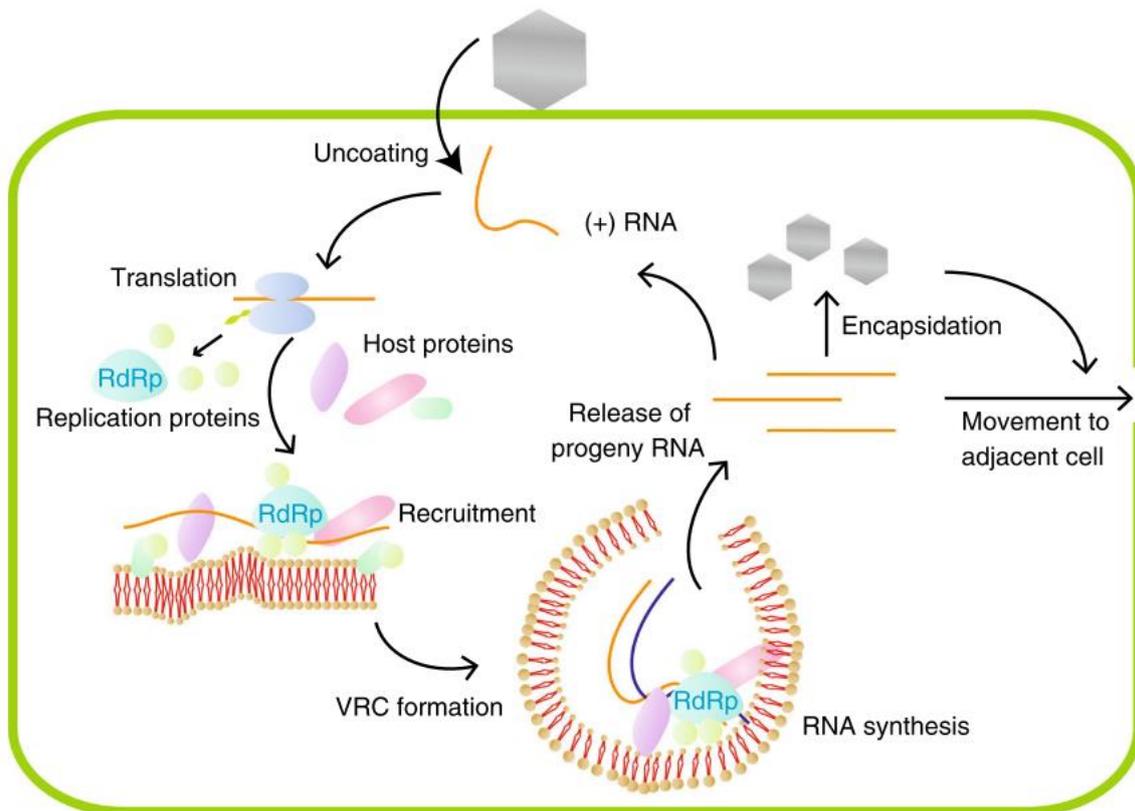


Figure 4 : Représentation schématique du cycle d'infection des virus à ARNs(+)^b de plantes.

Après leur entrée dans les cellules hôtes, les ARN génomiques viraux sont libérés des virions dans le cytoplasme, où ils sont traduits par les ribosomes de l'hôte. Les protéines de réplication virale résultantes ciblent et recrutent les protéines hôtes vers les membranes intracellulaires où elles forment des complexes de réplication virale (VRC), comprenant également le génome du virus. Le VRC synthétise un ARN à brin négatif complémentaire (ARN(-)) en utilisant l'ARN génomique d'origine comme matrice. L'ARN(-) est ensuite utilisé comme matrice pour synthétiser un grand nombre de nouveaux ARN (+). Les ARN de la descendance (+) sont libérés des VRC et subissent des cycles supplémentaires de traduction et de réplication, ou se déplacent vers des cellules adjacentes, ou sont encapsidés dans des virions. **Kiwamu Hyodo and Tetsuro Okuno, 2014. Host factors used by positive-strand RNA plant viruses for genome replication [79].**

D'autres protéines virales et hôtes sont recrutées dans les VRC souvent par le biais d'interactions protéine-protéine avec l'ancrage membranaire. Les facteurs hôtes, telles que les chaperonnes et les kinases, peuvent réguler le repliement et les interactions des protéines virales [80,81]. Pour certains virus, les protéines de réplication virale (RdRp) sont introduites dans les VRC en tant que précurseurs de polyprotéines qui incluent le domaine de l'ancrage membranaire [82]. Ces précurseurs ont souvent des activités différentes par rapport aux protéines matures correspondantes. Ainsi, le traitement régulé des précurseurs par les protéinases virales offre des opportunités supplémentaires pour contrôler l'expression au cours des différentes étapes de la réplication [83–85].

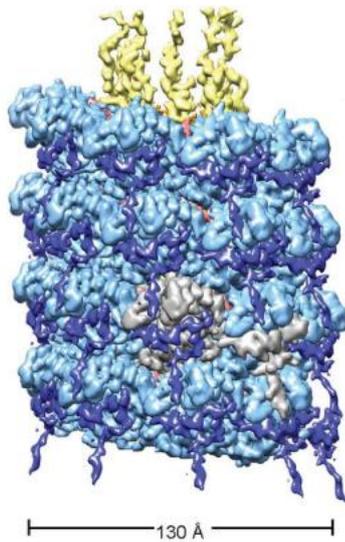
La dernière étape de la réplication virale est la synthèse de l'ARN qui formera la descendance. Un ARN complémentaire négatif (-) est synthétisé par le RdRp viral en utilisant l'ARN(+) comme matrice. Les éléments agissant en Cis, situés à l'extrémité 3' de l'ARN(+), sont constitués de structures secondaires d'ARN, telles que des tiges-boucles et des pseudos-nœud [86–88]. Ceux-ci sont reconnus par le RdRp et agissent comme des promoteurs pour la synthèse de l'ARN(-). Une hélicase virale est, dans la plupart des cas décrit, responsable du déroulement des régions d'ARN double brin formées lors de la synthèse de l'ARN(-). Cela permet à l'ARN(-) nouvellement formé de servir de modèle pour la synthèse de l'ARN(+) de la progéniture [89]. L'ARN descendant (+) est synthétisé en excès de 10 à 100 fois par rapport à l'ARN(-) brin, ce qui suggère que des mécanismes sont en place pour réguler l'activité du RdRp pendant la synthèse des brins d'ARN [74,90].

Les Potyvirus et l'organisation de leur génome

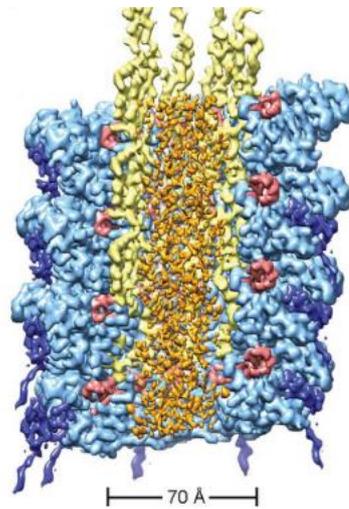
Le genre des Potyvirus appartient au virus du groupe IV et à la famille des *Potyviridae*. Cette famille comprend 8 genres et plus de 190 espèces dont plus de 140 appartiennent au genre des Potyvirus selon le Comité international sur la taxonomie des virus (2014 ; <https://talk.ictvonline.org/>) [91]. Les Potyvirus sont responsables de pertes significatives dans de nombreuses cultures [48,57]. Ils sont généralement transmis de manière non-persistantes par des insectes vecteurs tel que les pucerons. Ils sont dans de rares cas, transmis par les semences. Les symptômes sur les plantes infectées par des Potyvirus peuvent différer. Généralement, les plantes présentent des motifs en mosaïque sur les feuilles, un retard de croissance, un enroulement des feuilles et une déformation des fruits.

En général, les membres de cette famille ont une particule virale flexible, dont le diamètre varie de 11 à 15 nm et la longueur entre 650 et 950 nm (Figure 5). Le génome des *Potyvirus* est d'environ 10 kb et est formé d'ARNsb(+). À l'extrémité 5' de l'ARN, la protéine virale VPg est liée de manière covalente à l'ARN et l'extrémité 3' de l'ARN est polyadénylée. Ces éléments sont essentiels pour que la machinerie de l'hôte initie la traduction du génome viral comme s'il s'agit d'un ARNm [92]. À l'exclusion des UTR, la partie restante du génome viral est composée de deux cadres de lecture ouverts (ORF), avec un court ORF intégré dans le cistron P3 [93]. Ces deux ORF codent pour une polyprotéine de 358 kDa et une protéine de 7 kDa appelée PIPO (Pretty Interesting *Potyviridae* ORF), respectivement. La polyprotéine est clivée par trois protéinases virales en dix protéines matures. Ces protéines virales sont P1, HC-Pro, P3, 6K1, Hélicase ou inclusions cylindriques (CI), 6K2, VPg, Pro, ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) et CP. Le PIPO est traduit par une fusion de protéines avec la partie N-terminale de la protéine virale P3, qui est appelée P3N-PIPO en raison du glissement au niveau transcriptionnel [94].

A



B



C

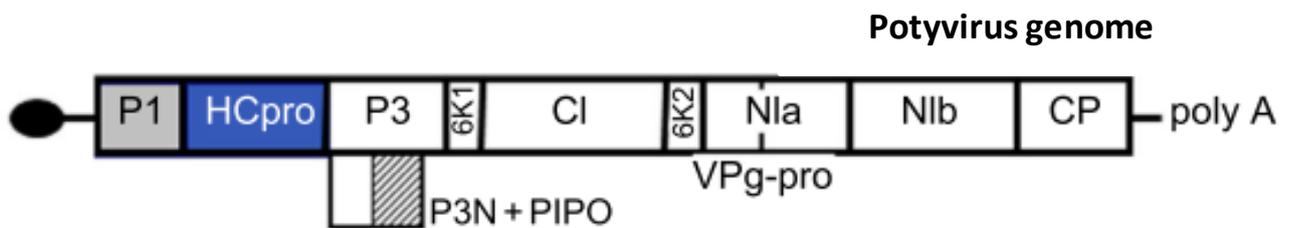


Figure 5 : Structure du virion et du génome des Potyvirus.

(A et B) Structure des virions de WMV. (B) Rendus en coupe calculé pour le WMV. Les densités segmentées sont représentées tel que : la région centrale de la CP du WMV en bleu clair, le bras N-terminal en bleu foncé et le bras C-terminal en jaune. Le côté intérieur de l'hélice en orange et l'ARNsb+ en rouge. **Extrait de Mikel Valle et al., 2017. Potyvirus virion structure shows conserved protein fold and RNA binding site in ssRNA viruses** [95]. (C) Cartes du génome du genre Potyvirus. Le long cadre de lecture ouvert est représenté comme une boîte divisée en produits finis par des lignes noires. L'ORF de la protéine PIPO est indiqué comme une zone striée sous la région P3. La protéine terminale (VPg) est représentée par un cercle noir. **Adapté de Frédéric Revers et Juan Antonio García, 2015. Molecular biology of Potyviruses** [96].

Les protéines virales associées à la réplication RdRp, VPg-Pro et CI.

La RdRp est responsable de la synthèse des ARN viraux. Cette protéine contient deux signaux de localisation nucléaire et peut faire la navette entre le cytoplasme et le noyau. Cependant, le rôle de cette mobilité n'est pas connu. La présence de la RdRp dans la vésicule de réplication virale (VRC) a été démontrée et est médiée par l'interaction de la RdRp avec le domaine VPg et Pro du complexe 6K2-VPg-Pro [97,98].

Les séquences codant pour VPg-Pro comprennent essentiellement deux cistrons en raison de la présence d'un site de clivage sous-optimal interne [99]. La protéine virale VPg peut être uridyliée par le RdRp, permettant à la VPg d'agir comme une amorce pour la synthèse complémentaire de brins d'ARN. Il a été démontré que plusieurs facteurs de protéine hôte interagissent avec le RdRp [100]. L'hélicase contient plusieurs domaines de liaison à l'ARN [101]. Son activité ATPase et ARN hélicase est requise pour la synthèse d'ARN. De plus, l'hélicase s'associe à la protéine CP du virus et se localise au voisinage des plasmodesmes (PD), suggérant qu'elle joue un rôle dans le mouvement du virus [102,103].

La protéine CI est le plus gros produit du génome des Potyvirus. Il forme des inclusions cylindriques très caractéristiques en forme de moulinet dans le cytoplasme des cellules infectées. La protéine CI présente une activité adénosine triphosphatase (ATPase) et ARN hélicase [104]. Elle joue un rôle dans la réplication de l'ARN et pendant la traduction en aidant à dérouler l'ARN. La protéine CI est aussi impliquée dans le mouvement viral, ce qui concorde avec sa présence dans des structures proches des plasmodesmes [105].

Les protéines transmembranaires 6K2 et 6K1

La protéine virale 6K2, qui a un poids moléculaire de 6 kDa, est la seule protéine virale identifiée chez les Potyvirus responsable de la formation de vésicules de réplication [106]. 6K2 est caractérisée comme une protéine associée à la membrane composée d'une queue N-terminale de 19 acides aminés, d'un domaine transmembranaire de 23 acides aminés et d'une queue C-terminale de 11 acides aminés. Elle adopte une topologie où la queue N-terminale est située dans le cytoplasme et la queue C-terminale est située dans la lumière [107].

Aucune fonction de 6K1 n'a été rapportée, malgré le fait que 6K1 soit présent sous forme de protéine mature au cours de l'infection virale [108]. Les seules informations sont que 6K1 est recruté par 6K2 au niveau des VRC et que la complémentation en trans de la protéine 6K1 n'est pas suffisante pour compléter la perte de sa capacité d'infectivité d'un Potyvirus KO pour 6K1 [109].

Protéines virales associées au mouvement : P3N-PIPO, HC-Pro et CP

Les virus végétaux codent pour une ou plusieurs protéines appelées protéines de mouvement (MP) pour permettre la propagation du virus de cellule à cellule et de manière systémique. Dans le cas des Potyvirus, il n'y a pas de MP définie. Cependant, certaines protéines codées par le génome des Potyvirus ont certaines propriétés qui peuvent les classer comme MP. La protéine virale P3N-PIPO suit la voie sécrétoire, se localise aux plasmodesmes (PD) et se déplace de manière intercellulaire [105,110]. Le niveau d'expression de P3N-PIPO peut moduler le dépôt des CI virales au niveau des PD, ce qui peut affecter davantage la formation d'une structure conique pour le mouvement du virus [110].

La protéine HC-Pro se distingue par trois domaines : le domaine N-terminal est requis pour la transmission par les pucerons, le domaine central est impliqué dans la suppression de l'ARN silencing de l'hôte et le domaine C-terminal porte une activité protéase ciblant la polyprotéine virale [111]. Il a également été démontré que la HC-Pro joue un rôle dans le mouvement des virus [112]. La protéine a une distribution cellulaire uniforme dans tout le cytoplasme, sous forme de grandes inclusions cytoplasmiques amorphes ou de petites inclusions en forme de points dans le cytoplasme qui s'associent au réticulum endoplasmique (ER) et aux microtubules (MT) [113]. HC-Pro interagit avec plusieurs autres protéines virales, telles que l'hélicase, P1 et VPg-Pro. De nombreuses interactions entre les protéines hôtes et HC-Pro ont également été identifiées [114,115]. Récemment, il a été démontré que HC-Pro améliore la stabilité des CP viraux et régule à la hausse le rendement des virions, ce qui entraîne la production d'une descendance virale plus infectieuse [116].

La CP est nécessaire pour l'assemblage des particules virales, le mouvement intercellulaires et à longue distance. Jusqu'à 2000 copies de la CP forment le bouclier protecteur de la particule virale. Structurellement, les domaines N et C terminaux de la CP sont exposés à la surface de la particule et permettent des interactions entre sous-unités, facilitant l'assemblage de la particule virale [117]. Il a également été montré que les domaines N et C-terminaux sont nécessaires dans le mouvement à longue distance du virus, tandis que le domaine central est essentiel pour le mouvement intercellulaire du virus. La protéine virale CP peut également augmenter la limite d'exclusion de taille du PD, provoquant la transmission d'une infection virale de cellule à cellule [118,119].

Les protéines P1 et P3

Le produit N-terminal de la polyprotéine constitue la protéine virale P1 des Potyvirus. Cette protéine est caractérisée comme l'une des protéases virales. Elle fonctionne à la jonction de P1 et HC-Pro, et conduit à la libération de la protéine virale P1 de la polyprotéine [120]. La partie N-terminale de P1 porte le domaine non protéolytique et est non essentiel pour l'infection virale. Au contraire, la partie C-terminale qui contient le domaine protéolytique et le site de reconnaissance du clivage de protéase est requise pour la viabilité du virus [121].

P1 est également une protéine de liaison aux acides nucléiques [122]. La protéine P1 est associée aux inclusions induites par l'hélicase CI [123]. Des données plus récentes montrent que P1 présente une localisation subcellulaire dynamique, la protéine entrant et sortant du noyau au stade précoce de l'infection virale [124]. La suppression de P1 affecte la réplication du virus, et les mouvements de cellule à cellule et systémiques se produisent à un rythme réduit. Lorsque P1 est complété en trans, l'efficacité de la réplication virale est augmentée de plusieurs fois en comparaison à une infection normale [121]. P1 interagit avec les sous-unités ribosomales de l'hôte 60S pendant l'infection, ce qui stimule la traduction des protéines virales [124].

La protéine P3 est caractérisée comme un déterminant de la pathogénicité des plantes. En échangeant les fragments du génome P3 de deux isolats de TuMV, les souches UK1 et CDN1 ont montré des symptômes d'infection commutés. Il a été démontré que P3 détermine le phénotype d'infection et l'avirulence du TuMV [125,126]. Le clivage de la protéine précurseur P3-6K1 joue également un rôle régulateur pendant l'infection virale [127]. De plus, la protéine P3 est impliquée dans la réplication du virus. P3 s'est avéré s'associer à la réplicase virale RdRp dans les cellules infectées [128].

Les voies de transport cellulaires

Il a été démontré que les virus végétaux ont besoin de détourner les voies de formation et de transport des vésicules pour l'infection de la cellule hôte (voir ci-dessous). Par conséquent, un aperçu des mécanismes impliqués chez les cellules végétales est donné ici.

Le transport ou le recyclage de composés cellulaires tels que des protéines, molécules ou lipides entre les différents organites ou vers le milieu extra-cellulaire implique la déformation des membranes aboutissant à la formation de vésicules [129,130]. Le trafic membranaire dans la cellule est réalisé par des mécanismes essentiels et conservés au cours de l'évolution. Des gènes homologues impliqués dans ces mécanismes se retrouvent dans toutes les cellules eucaryotes et dans certaines archées [131–133]. La formation de vésicules cytosoliques, également appelées vésicules externes, peut être divisée en plusieurs étapes, à savoir : la déformation endomembranaire, le mouvement des vésicules et la fusion avec les organites ciblés ou avec la membrane plasmique. Ces composés proviennent de la lumière du compartiment d'origine ou sont associés à la membrane. Les vésicules lumineales, également appelées vésicules internes, se forment à l'intérieur de la lumière des organites. Ces vésicules transportent des composés issus du cytosol et de la membrane de l'organite. L'inactivation des mécanismes associés à la formation de vésicules externes ou interne est généralement létal si elle n'est pas compensée par une voie alternative ou par une protéine à fonction homologue [129,130,134].

Dans la cellule végétale, COPI et COPII sont responsables de la déformation endomembranaire et de la formation des vésicules externes entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (figure 6). Après le transport de la vésicule vers l'organite ciblé, la fusion est réalisée par le complexe SNARE (N-ethylmaleimide-Sensitive-factor Attachment protein Receptor). Des vésicules internes ont été observées principalement pour la formation de corps multivésiculaires (MVB). Ces vésicules sont fabriquées par l'ESCRT. Certaines des protéines ESCRT sont également impliquées dans la division cellulaire [135,136].

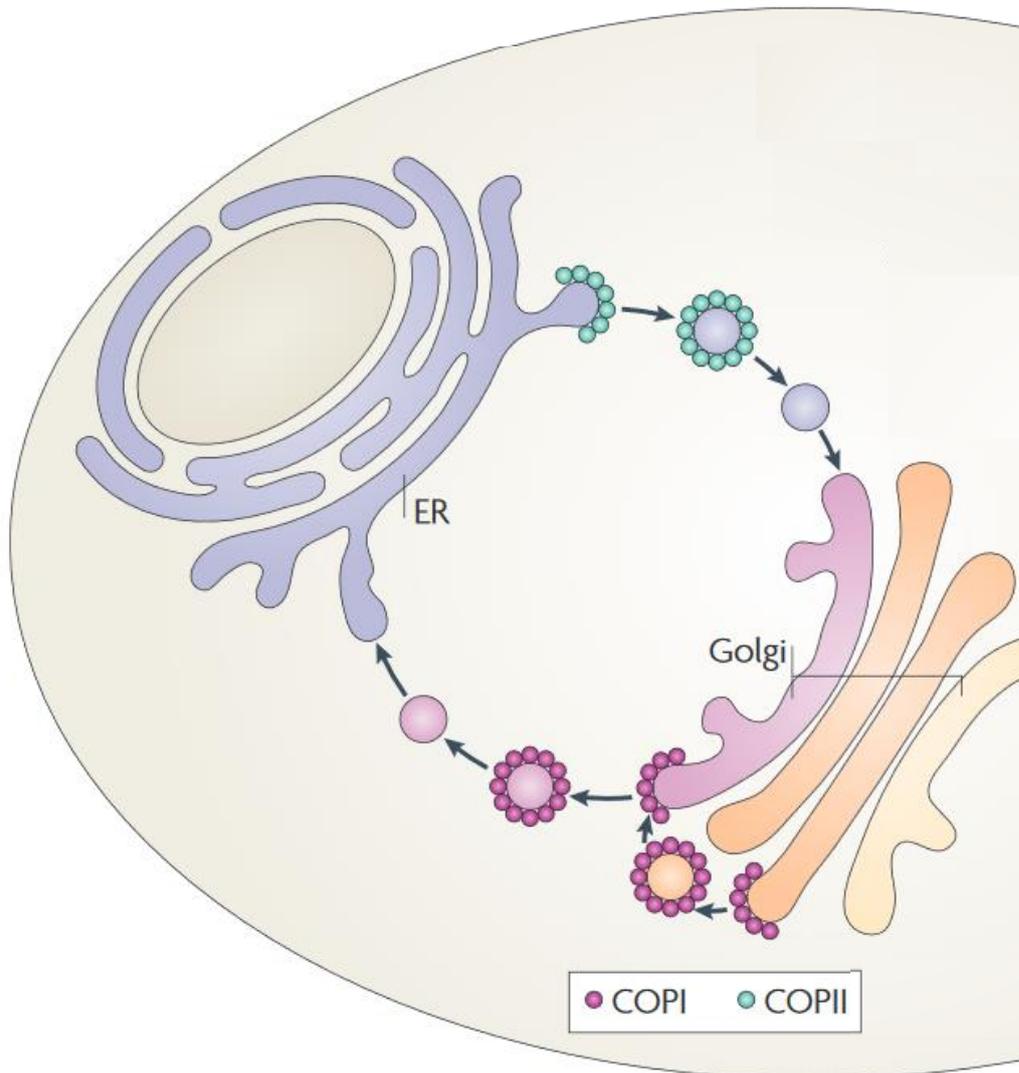


Figure 6 : Voies de transport vésiculaire par les protéines COPI/COPII.

Les protéines COPII (vert) forment des vésicules pour le transport antérograde du réticulum endoplasmique (ER) vers l'appareil de Golgi, tandis que les protéines COPI (rouge) forment des vésicules pour le transport intra-Golgi et le transport rétrograde du Golgi vers l'ER. **Adapté de Jia-Shu Yang et al., 2009. The evolving understanding of COPI vesicle formation [137].**

Formation et fusion des vésicules externes

La plupart des protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique (ER) ont une fonction dans un autre compartiment ou dans le milieu extracellulaire. Les protéines COPII agissent sur le ER pour former des vésicules externes permettant l'exportation des protéines, principalement à travers l'appareil de Golgi (GA). Six composés minimaux sont nécessaires pour la formation de vésicules sur le RE, à savoir : la GTPase SAR1, SEC12, l'hétérodimère SEC23 / SEC24 et SEC13 / SEC31. L'activation de SAR1 par le facteur d'échange de guanidine GTP SEC12 est la première étape de l'assemblage du manteau. SEC12 est une protéine transmembranaire associée à ER, qui régule l'activation de COPII uniquement dans cette localisation. La liaison du GTP à SAR1 permet à la protéine de se lier à la membrane ER. Une fois que SAR1 est ancré à la membrane ER, il recrutera l'hétérodimère SEC23 / SEC24 par une interaction directe avec SEC23. Ensuite, le recrutement de SEC13 / SEC31 et sa multimérisation autour de la vésicule forment le manteau. Le désassemblage du complexe COPII se fait par hydrolyse du GTP de SAR1 [133,138–142].

L'appareil de Golgi (GA) est une composante majeure du mouvement des protéines et donc du trafic des vésicules. Les vésicules se déplaçant entre les compartiments du GA, sortant du GA ou retournant à l'ER, sont régulées par COPI. Les composants minimaux de COPI sont l'ARF1, le facteur d'échange de guanidine GTP GBF1, le complexe d'enveloppe hétéro-heptamérique et une queue cytoplasmique du récepteur cargo. ARF1 est activé par le facteur de protéine GTPase GFB1 associé au GA, lui permettant de s'ancrer à la membrane GA. Suite à la liaison ARF1, la protéine recrute le complexe d'enrobage. Comme dans les mécanismes COPII, le complexe de revêtement déforme la membrane pour former les vésicules arrière. Le démontage du COPI se fait par hydrolyse de l'ARF1 [140,143,144].

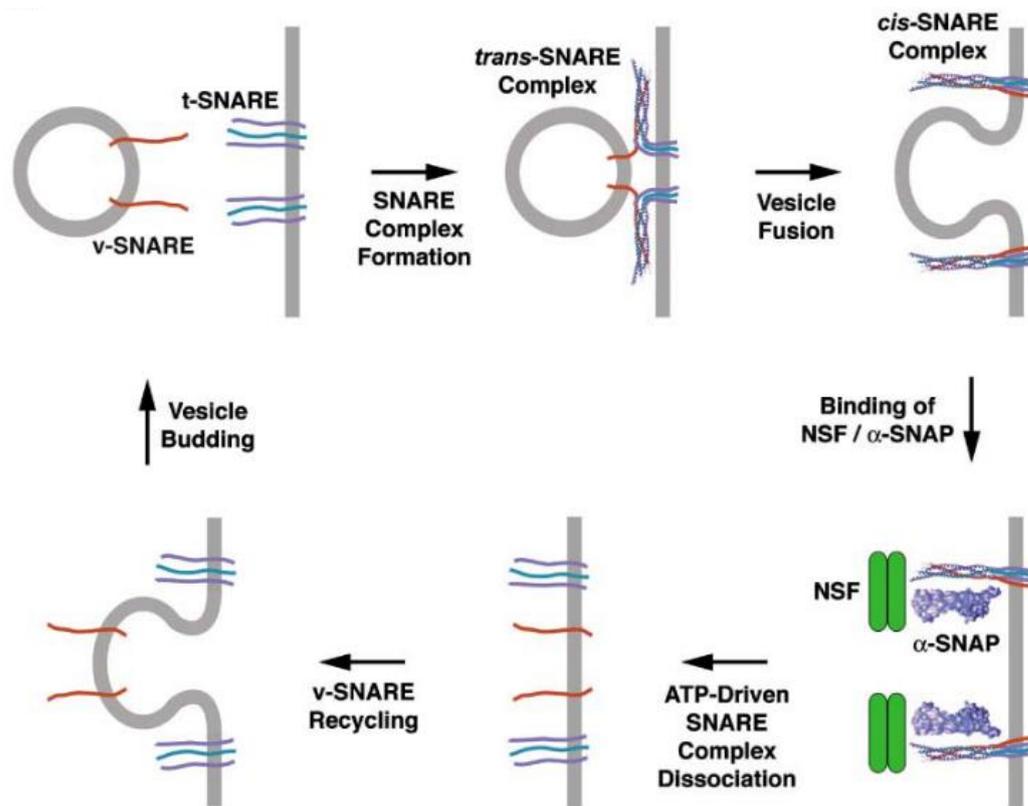


Figure 7 : Fusion des vésicules médiées par les protéines SNAREs

Un complexe trans-SNARE s'assemble lorsqu'un v-SNARE monomère sur la vésicule se lie à un t-SNARE oligomère sur la membrane cible, formant un faisceau stable à quatre hélices qui favorise la fusion. Le résultat est un complexe cis-SNARE dans la membrane fusionnée. La protéine α -SNAP se lie à ce complexe et recrute NSF, qui hydrolyse l'ATP pour dissocier le complexe. Les v-SNARE non appariés peuvent ensuite être à nouveau conditionnés dans des vésicules. **Adapté de Juan S. Bonifacino et Benjamin S. Glick, 2004. Review: The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion [129].**

Les vésicules externes étant libres dans le cytosol, elles doivent fusionner avec la membrane de l'organite ciblé grâce aux protéines SNARE qui régulent l'adressage et la fusion de la vésicule (figure 7). Les protéines SNARE sont localisées dans la membrane de la vésicule et dans la membrane de destination. Généralement, elles sont ancrées à la membrane via un domaine transmembranaire situé dans la région C-terminale de la protéine. Les protéines SNARE agissent chez le donneur et les partenaires récepteurs : les protéines V-SNARE sur la vésicule du compartiment donneur interagissent avec plusieurs protéines t-SNARE localisées sur l'organite récepteur. Cette interaction rend la vésicule et la membrane du compartiment suffisamment proches pour induire une fusion. Cette fusion a été démontrée *in vitro* en utilisant des vésicules reconstituées, mais les détails de ces événements ne sont pas bien connus. Après la fusion, une protéine de fusion sensible au N-éthylmaléimide (NSF) et une protéine de fixation NSF (α -SNAP) sont recrutées pour désassembler le complexe SNARE. Jusqu'à présent, au moins 56 membres de la famille SNARE ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* [129,133,145–147].

Formation des vésicules internes

La voie de dégradation des protéines utilise des vésicules rétrogrades pour transporter les protéines d'un compartiment ou d'une membrane plasmique à l'endosome, qui est destiné à fusionner avec le lysosome [148]. Pour leur dégradation, les protéines transmembranaires doivent également se déplacer à l'intérieur de l'endosome et ne pas rester sur la membrane du compartiment (figure 8). Ainsi, des vésicules internes se forment dans la lumière de l'endosome. Les vésicules ainsi formées sont appelées ILVs (Intra-luminal vesicles) et le compartiment dans lesquels on les trouve s'appelle les MVBs (Corps multivesiculaires). Les MVBs vont fusionner avec le lysosome, libérant la vésicule dans la lumière du lysosome pour être dégradée avec les protéines qu'elles transportent dans leur membranes [149–151]. Le complexe ESCRT (Endosomal sorting complexes required for transport) est responsable de la formation de vésicules internes dans les MVBs. Certaines protéines de l'ESCRT ont également été impliquées dans la cytokinèse [134]. L'ESCRT est fortement conservée dans tous les organismes eucaryotes et bien décrit chez les levures et les mammifères [135,152]. Il n'a été décrit que récemment chez les plantes, principalement par homologie [153,154].

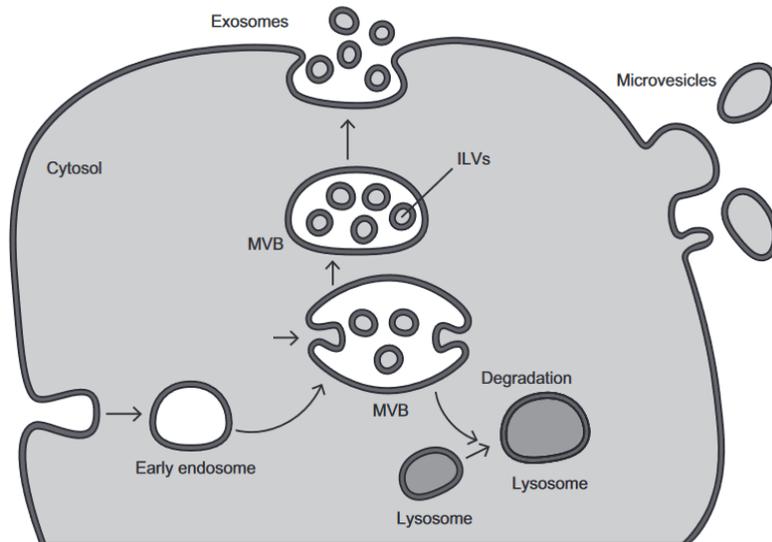


Figure 8 : Illustration de la biogenèse et de l'adressage des corps multivésiculaires (MVBs).

La biogenèse des MVBs commence par l'invagination précoce de la membrane endosomale pour créer des vésicules intra-luminales (ILVs). Les MVBs vont soit fusionner avec des lysosomes/vacuoles, permettant la dégradation des ILVs. Soit ils fusionnent avec la membrane plasmique, libérant des exosomes dans l'espace extracellulaire. **Adapté de Fei-Fei Liu et al., 2016. MicroRNAs in extracellular vesicles [149].**

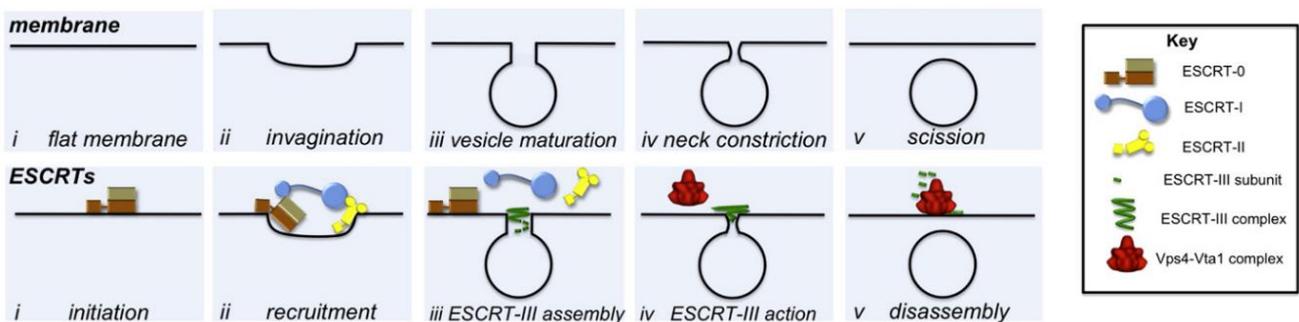


Figure 9 : Bourgeonnement vésiculaire médié par l'ESCRT

La vue de dessus est du point de vue de la membrane, montrant qu'il y a cinq stades distincts de bourgeonnement ILV. Une membrane plate (i) est invaginée (ii) et mûrie en une vésicule qui est toujours attachée à la membrane par une structure en « cou » (iii). Le cou peut subir une constriction (iv) et un événement de scission (v) pour terminer le bourgeonnement des vésicules. La vue de dessous est du point de vue de la protéine ESCRT, dans laquelle ESCRT-0 initie la voie en engageant la cargaison ubiquitinée (i), jusqu'à ce qu'elle soit séquestrée et triée par ESCRT-III (iv et v). Les complexes ESCRT-I et ESCRT-II lient la cargaison entre eux pour créer une zone enrichie en ESCRT (ii). ESCRT-II induit l'assemblage de l'ESCRT-III (iii), qui entraîne le bourgeonnement des vésicules (iv) et est désassemblé par le complexe Vps4-Vta1 (v). **Adapté de William M. Henne, Nicholas J. Buchkovich et Scott D. Emr, 2011. The ESCRT Pathway [155].**

Le complexe ESCRT est divisé en cinq petits complexes (complexe ESCRT-0, I, II, III et VPS4) (figure 9). Après l'initiation de l'ESCRT à la membrane endosomale, chaque protéine sera recrutée grâce à l'interaction avec le composant précédent du complexe, résultant en une cascade linéaire d'interaction. ESCRT-0 est recruté par un signal d'ubiquitine sur les protéines transmembranaires et les lipides phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) (Figure 10). ESCRT-0 est composé d'un hétérodimère des protéines VPS27 et HSE1. Une fois ancré à la membrane, il initie le recrutement d'autres complexes ESCRT. ESCRT-0 est le moins conservé des complexes ESCRT et aucun homologue n'a été identifié chez les plantes. Le complexe ESCRT-I a besoin de ESCRT-0 pour se lier à la membrane mais interagit également avec l'ubiquitine et le PI3P. ESCRT-I est un hétérotétramère formé avec VPS23, VPS28, VPS37 et MVB1. Chez les plantes, des homologues ont été identifiés à l'exception de MVB1. ESCRT-II est recruté suite à ESCRT-I. Ils commencent tous les deux à déformer la membrane en induisant une courbure vers l'intérieur. Le complexe ESCRT-II est composé de VPS36, VPS22 et deux VPS25. Il ne peut interagir qu'avec l'ubiquitine et sur un seul site d'interaction. Puis le complexe ESCRT-III est recruté. Il ne peut pas interagir avec l'ubiquitine et les lipides. Dans le cytosol, les protéines ESCRT-III sont sous une forme monomère et inactive. La première protéine ESCRT-III VPS20 est recrutée par l'interaction de VPS22 et VPS25. La deuxième protéine SNF7 est recrutée et forme un polymère en chaîne. Le filament de SNF7 est formé autour du col de l'invagination faite par les ESCRT-I et II. La fin du filament est faite par l'interaction avec VPS24 et VPS2. Le démontage de ESCRT-III est nécessaire pour fermer la vésicule. L'AAA ATPase VPS4 permet d'éliminer les unités SNF7 grâce à son activité hydrolytique [33–36]. Le complexe VPS4 est composé de plusieurs unités de VPS4 et de cofacteurs [37]. Le désassemblage ESCRT est médié par VPS4, qui ferme le col de la vésicule et libère la vésicule à l'intérieur du compartiment. Toutes les protéines de l'ESCRT restent dans le cytosol [155–160]. Fait intéressant, le complexe VPS4 et ESCRT-III sont les plus conservés des protéines ESCRT dans les cellules eucaryotes et des homologues de certaines de ces protéines ont été identifiés chez Archaea [131,159].

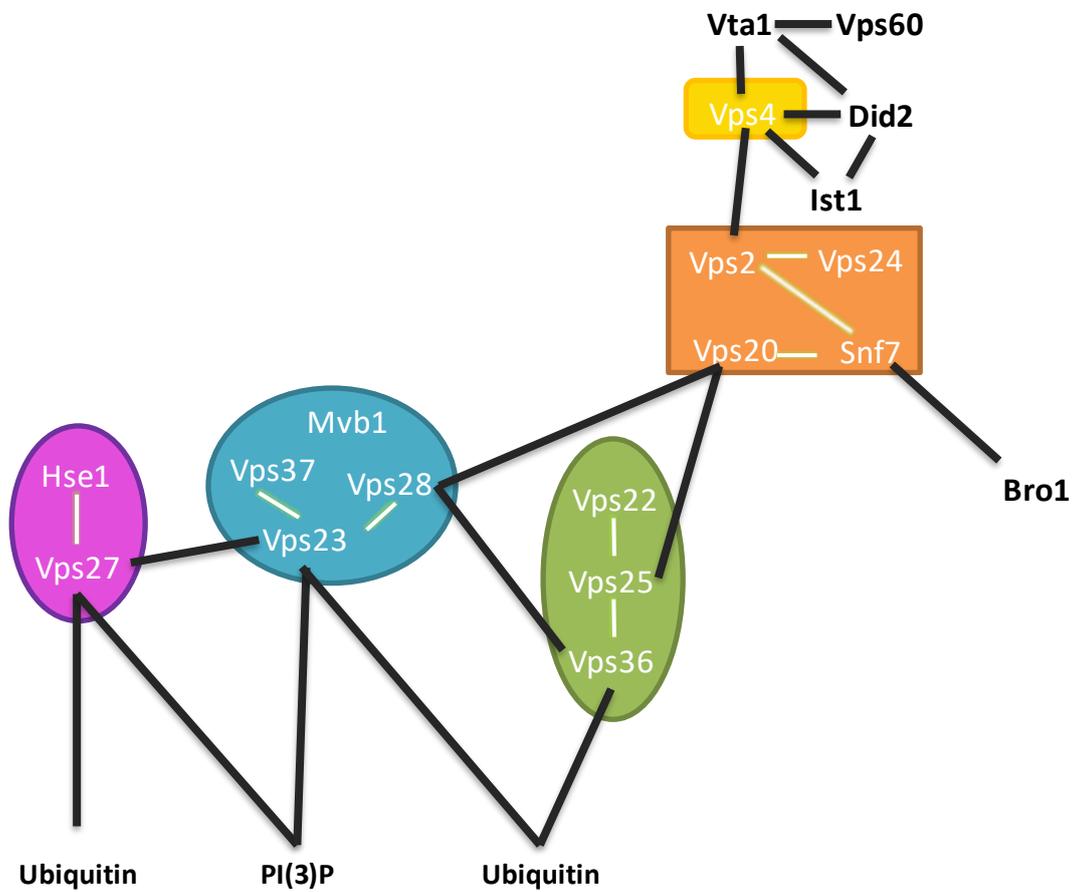


Figure 10 : Carte des principaux composants de la biogénèse des corps multivésiculaires.

Représentation schématique des interactions protéine-protéine entre les composants impliqués dans le tri MVB. ESCRT-I, -II et -III sont représentés dans les boîtes bleu, vert et orange respectivement. Le complexe ESCRT-0 composé de VPS27-HSE1 non identifié chez les plantes est représenté en rose. Le complexe VPS4 est représenté en Jaune. **Adapté de Robert C. Piper et David J. Katzmann, 2007. Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies [157].**

Association des membranes intracellulaire de l'hôte avec les complexes de réplication viraux chez les Potyvirus

Les événements cellulaires et moléculaires conduisant à l'apparition de symptômes chez une plante infectée par des virus sont mal connus. Les virus exploitent à leur avantage les mécanismes cellulaires de l'hôte, ce qui interfère probablement avec le métabolisme et le développement des plantes [161]. Ainsi, de nombreuses études ont permis d'améliorer la compréhension des interactions des virus avec leurs hôtes [162,163]. Le rôle joué par de nombreux facteurs hôtes à chaque étape de la réplication virale a été décrit, bien que de nombreux facteurs non identifiés demeurent.

L'utilisation des membranes par les virus à ARNs^b(+) par le biais de l'ESCRT et de VPS4 est largement décrite pour les virus infectant les animaux, notamment pour les virus humain du papillomavirus (HPV) et du VIH [164,165]. L'absence d'enveloppe chez les virus de plante a retardé l'intérêt porter à ces mécanismes pourtant essentiels chez les virus de plantes. Ces dernières années, le rôle majeur du transport vésiculaire dans l'infection virale a été mis en évidence [166]. La réplication de la plupart des virus à ARNs^b(+) est associée à des changements structurels des membranes intracellulaires. Le virus forme des vésicules et des quasi-organites, appelés complexe de réplication virale (VRC), qui combinent tous les éléments nécessaires à la réplication de l'ARN viral et à la traduction des protéines virales [167–169]. Les VRC sont confinés dans des structures définies augmentant l'efficacité de réplication et empêchant l'activation des mécanismes de défense cellulaire tels que la reconnaissance de l'ARN double brin lors de la réplication [166,170]. Les membranes font partie intégrante de la formation des VRC. Leurs origines et leurs destinations finales sont différentes selon les virus et elles sont plus ou moins décrites. Des études semblent montrer que la plupart des compartiments cellulaires peuvent être une cible pour la formation de VRC mais que chaque virus utilise un compartiment hôte défini [171]. Le caractère essentiel de l'ancrage des VRC d'ARNs^b(+) dans la membrane a été démontré à plusieurs reprises chez la levure par des approches Knock-Out des mécanismes de trafic endomembranaire [172–176]. Chez les plantes, l'inhibition transitoire de ces mécanismes a montré une réduction similaire de l'efficacité de réplication virale [177,178].

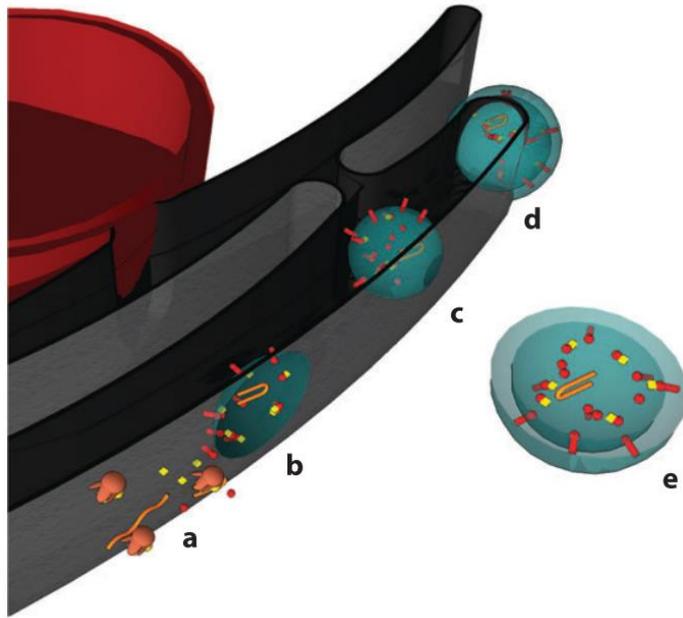


Figure 11 : Modèle pour la formation de vésicules induites par le virus sur le réticulum endoplasmique (ER).

La grande sphère rouge et la structure grise représentent respectivement le noyau et le ER. Les vésicules partiellement transparentes induites par le virus sont représentées en bleu. Les rubans orange et les petites sphères ou bâtonnets rouges représentent respectivement des ARN viraux et des protéines. Les protéines hôtes sont représentées par les cubes jaunes et les structures brunes représentent les ribosomes. (a) Lors de la libération de l'ARN génomique dans le cytoplasme, la production de protéines virales a lieu sur les ribosomes associés aux ER. (b) Au cours de la traduction de l'ARN viral, les

protéines virales ciblant la membrane s'accumulent en plaques sur la membrane externe du ER et initient la courbure de la membrane. (c) La courbure de la membrane augmente avec l'accumulation des composants de réplication, ce qui conduit finalement à la formation de sphérules / vésicules à membrane unique à l'intérieur de la lumière de l'organite, qui peuvent ou non avoir une connexion en forme de pore avec l'extérieur. (d) La vésicule produite après un premier événement de bourgeonnement dans la lumière du ER subit un deuxième événement de bourgeonnement, acquérant une deuxième membrane, et (e) se détache du ER pour donner naissance à une vésicule à double membrane. **Adapté de Laliberté et Sanfaçon, 2010. Cellular Remodeling During Plant Virus Infection [171].**

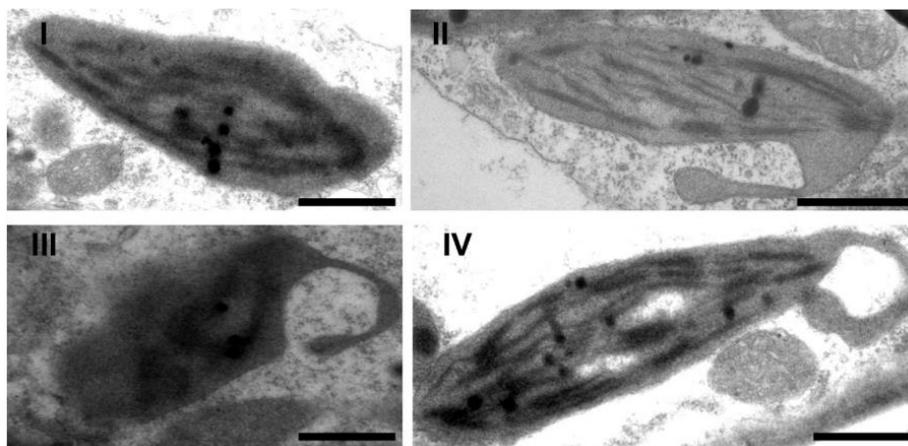


Figure 12 : Micrographies électroniques à transmission de chloroplastes anormalement déformés contenant des vésicules liées à la membrane dans des feuilles infectées par le TuMV.

(I) Chloroplaste dans une plante saine. (II) Chloroplaste avec extrusion liée à la membrane. (III et IV) Mise en forme amiboïde de chloroplastes, montrant les extrusions de chloroplaste encerclant une grande vésicule. Bars, 1 μ m. Chloroplast. **Adapté de Taiyun Wei et al., 2010. Sequential Recruitment of the Endoplasmic Reticulum and Chloroplasts for Plant Potyvirus Replication [179].**

Le *Turnip mosaic virus* (TuMV) est le principal modèle utilisé pour décrire la formation des vésicules dans les cellules infectées par les Potyvirus. Suite à l'infection et la traduction des protéines virales, le VRC du TuMV s'assemble au niveau du réticulum endoplasmique (ER) [106,180]. La formation de vésicules externes survenant dans le ER nécessite au moins le recrutement par interaction directe de la protéine COPII SEC24a par la protéine virale transmembranaire 6K2 [142,181]. Un modèle intéressant pour l'internalisation des VRC dans le ER et leur export vers le cytosol a été proposé par H. Sanfaçon et J-F. Laliberté (figure 11) [182]. Ces vésicules contiennent le VRC du TuMV, le génome du virus et tous les éléments de l'hôte permettant la réplication et la traduction du génome [170]. L'export des VRC du ER est essentiel à l'infectivité du virus. L'inhibition du mécanisme COPII bloque totalement sa réplication [180]. Les vésicules virales formées par la voie COPII sont détournées par le virus en direction des chloroplastes. Il a été démontré que la protéine SNARE SYP71 est essentiel à l'adressage et la fusion des vésicules virales. SYP71 est recrutée par une interaction indirecte avec 6K2. L'intermédiaire VAP27.1, par une interaction directe avec 6K2, recrute la protéine SYP71. VAP27.1 n'est cependant pas essentielle, suggérant l'existence d'autres intermédiaires pour le recrutement de SYP71 [183]. Les vésicules virales vont s'agglomérer au niveau de la membrane des chloroplastes pour former une vésicule plus grande. Ces dernières vont être entourées par la membrane des chloroplastes pour former une structure appelée Inclusion Cytoplasmique (CI) (Figure 12) [179]. Le devenir de ce compartiment viral n'est cependant pas connu. Des vésicules virales ont été identifiées s'associant avec les vacuoles. Des structures tubulaires sont formées au cours de l'infection par le TuMV en déformant le tonoplaste des vacuoles (figure 13) [184]. Les complexes constitués à l'intérieur de ce tubule contiennent les éléments tardifs de la réplication du virus et tous les éléments protéiques permettant l'assemblage des virions. Il est possible que ces structures dans lesquels on retrouve le facteur viral HC-Pro soient impliquées dans la transmission par puceron. L'origine des éléments viraux composant cette structure n'est cependant pas connue. Les protéines SNARE VT111 et SEC22 semblent impliquées dans l'adressage au MVB et/ou à la vacuole en contournant la voie normalement d'adressage devant transiter par le GA [185].

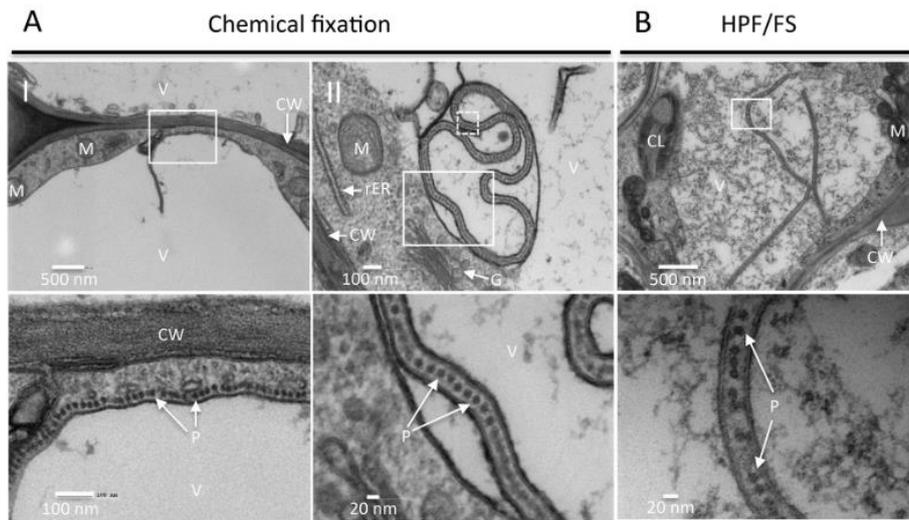


Figure 13 : Le TuMV acquiert une enveloppe en détournant le tonoplaste.

(A et B) *N. benthamiana* infectés de manière systémique avec le virus TuMV-6K2:GFP ont été fixés chimiquement (A) ou HPF (B), traités et observés par TEM. Une image à fort grossissement de la zone dans le rectangle blanc est affichée en bas. Des structures en forme de points monocouches sont alignées le long du tonoplaste (A, panneau I) et chargées dans la vacuole à partir du cytoplasme (A, panneau II et B). V, vacuole ; CW, paroi cellulaire ; M, mitochondrie ; rER, réticulum endoplasmique rugueux ; CL, chloroplaste ; P, particules. **Adapté de J-F. Laliberté et al., 2015. Ultrastructural Characterization of Turnip Mosaic Virus-Induced Cellular Rearrangements Reveals Membrane-Bound Viral Particles Accumulating in Vacuoles [184].**

La présence de vésicules virales dans les MVBs a également été démontrée (figure 14) [186]. Ces vésicules sont également retrouvées dans l'apoplasme suite à la fusion du MVB avec la membrane plasmique [187]. L'origine de ces vésicules n'est pas connue. *Movahed et al.*, (2019) proposent que les vésicules situées dans le milieu extra-cellulaire soient amenées à franchir les plasmodesmes pour infecter les cellules adjacentes. Il en serait de même pour l'infection systémique de la plante.

Association des membranes intracellulaire de l'hôte avec les complexes de réplication viraux chez les autres virus à ARNs(+)

Le *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), le *Cucumber Necrosis Virus* (CNV) et le *Cymbidium Ringspot Virus* (CymRSV) appartiennent au genre *Tombusvirus* de la famille des *Tombusviridae*. Ils induisent des déformations membranaires au niveau du peroxyosome chez la plante et la levure [188–192]. Ils forment des vésicules en forme de sphérules, similaires aux vésicules internes des MVBs, mais non détachées de la membrane du peroxyosome (Figure 15). Leurs VRCs maintiennent un port d'ouverture avec le cytoplasme [193]. Les peroxyosomes modifiés contiennent des protéines de réplication hôtes et virales et de l'ARN viral. Ces vésicules semblent se déplacer des peroxyosomes vers des peroxyosomes de *novo* dérivés du réticulum endoplasmique (pER) [191]. Il a été observé que l'absence de peroxyosome dans la levure due à la délétion de PEX3 ou PEX19 délocalise le VRC du TBSV vers le réticulum endoplasmique sans affecter la réplication [194]. À l'inverse, le virus *Carnation Italian ringspot virus* (CIRV, *Tombusvirus*) induit la formation de vésicules de type MVB dans la membrane mitochondriale [195] (Figure 16). Le *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) appartient au genre *Dianthovirus* de la famille des *Tombusviridae*. Il induit des modifications membranaires et une accumulation de protéines virales dans le réticulum endoplasmique [196]. La cinétique des événements lors de la formation des VRC des *Tombusvirus* est encore inconnue. Cependant, le rôle de l'ESCRT dans la distorsion induite par le virus a été démontré à plusieurs reprises. Le mécanisme SNARE semble également être impliqué dans le ciblage des vésicules virales du peroxyosome vers les pER [178,180,197,198].

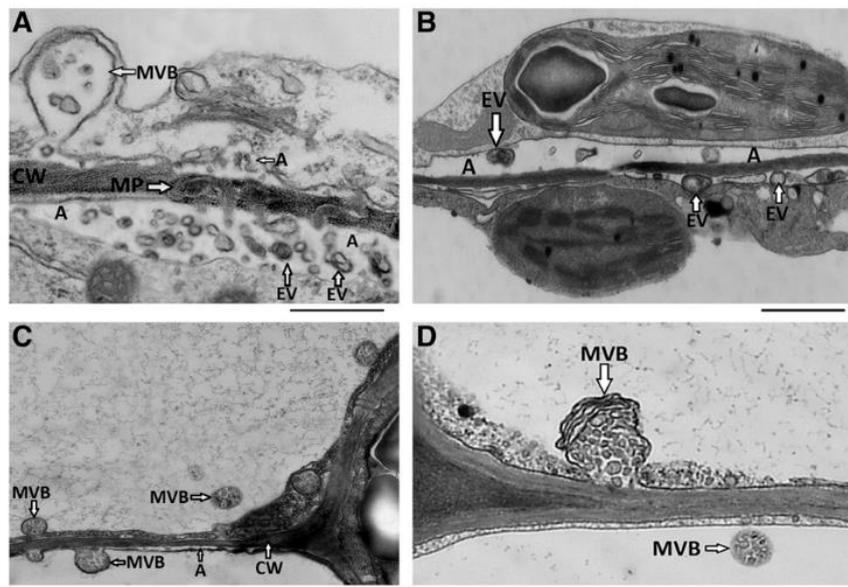


Figure 14 : Vésicules extracellulaires présentes dans l'espace intercellulaire des feuilles infectées par TuMV.

Les feuilles de *N. benthamiana* ont été agro-infiltrées avec *A. tumefaciens* contenant pCambiaTuMV/6K2: GFP ou pCambia vide et traitées pour TEM à 6 dpi. (A) Vésicules extracellulaires et un MVB fusionnant avec la membrane plasmique dans une cellule infectée par TuMV. (B) Vésicules extracellulaires dans des échantillons infectés. (C) Image à faible grossissement de MVB fusionnant avec la membrane plasmique dans une section infectée par TuMV. (D) Événement de fusion avec des vésicules intraluminales d'un MVB libéré dans l'espace extracellulaire au cours de l'infection par TuMV. Barres d'échelle = 500 nm. A, apoplaste; CW, paroi cellulaire; EV, vésicule extracellulaire; MP, plasmodesmes modifiés. **Adapté de Movahed et al., 2019. Turnip mosaic virus components are released into the extracellular space by vesicles in infected leaves [186].**

La protéine p33 des *Tombusvirus* est une protéine transmembranaire essentielle à la formation du VRC. Elle est impliquée dans un grand nombre d'interactions avec d'autres protéines virales et de protéines hôtes [75,192]. L'interaction de p33 avec les protéines ESCRT VPS23, VPS24, VPS20, VPS2 et VPS4 semble être responsable de la formation de vésicules internes au peroxysome, pER et ER [177,178,197,199]. Une interaction de p33 avec les protéines accessoires VPS34 et BRO1, impliquées dans la régulation de l'ESCRT, a également été décrite [197,200]. La protéine p33 porte un peptide signal de ciblage responsable de l'induction des vésicules COPI par interaction ARF1. L'inhibition de la protéine COPI ARF1 inhibe le mouvement des vésicules virales des peroxysomes vers les pER [190]. L'interaction directe de TBSV p33 avec SNARE UFE1 et USE1 a été montrée [198]. Leur suppression délocalise le VRC en membrane ER et réduit la réplication du TBSV chez la levure et les plantes [198]. Dans le CIRV, la protéine responsable de la formation du VRC a un domaine supplémentaire. Cette protéine, appelée p36, est responsable de la localisation du VRC dans les mitochondries, contrairement aux *Tombusvirus* codant pour un p33 [195,201]. Jusqu'à présent, seule l'interaction du VPS23 avec la protéine p36 du CIRV a été mise en évidence [178]. Cependant, p36 interagit avec TOM20, TOM22 et mtOM64 qui sont impliqués dans l'adressage des protéines mitochondriales [201]. La perte d'activité de la plupart de ces facteurs de sensibilité par délétion des protéines de trafic membranaire dans la levure ou la surexpression de mutants dominants négatifs dans les feuilles des plantes a conduit à une réduction significative de l'accumulation d'ARN [173,177,178,197,199].

Le *Brome Mosaic Virus* (BMV) appartient au genre *Bromovirus* et à la famille des *Bromoviridae*. Le BMV assemble ses VRC en détournant le RE. La localisation des vésicules virales n'est pas claire. BMV a été décrit induisant des invaginations de la membrane dans la lumière ER pour former des vésicules, qui sont reliées au cytoplasme par des cols étroits [202][84]. Une publication plus récente indique que le BMV induit des vésicules, qui sont libres à l'intérieur d'une inclusion cytoplasmique dans ER [203]. La protéine virale 1a est une protéine associée à la membrane grâce à une hélice amphipathique mais elle ne possède pas de domaine transmembranaire [204,205]. La protéine 1a peut induire la formation de sphérules dans la cellule sans autres protéines BMV [202]. La délétion de 7 protéines ESCRT : VPS12, VPS20, SNF7, VPS24, VPS2, VPS4 et DID2 dans la levure induit une réduction significative de la réplication de l'ARN BMV. De plus, la suppression de SNF7 conduit à une inhibition totale de

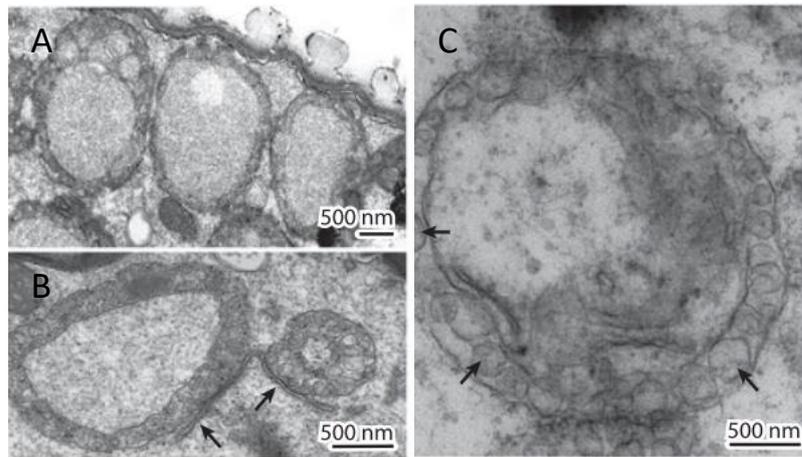


Figure 15 : Vésicules virales induites par le *Tomato bushy stunt virus* et le *Carnation italian ringspot virus*.

(A) et (B) Feuilles de *Nicotiana benthamiana* infectées par le *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) montrant des vésicules intraluminal (ILVs) dans les peroxisomes. Les flèches en (B) montrent deux ILVs de peroxysomes. **Adapté de McCartney Andrew W. et al., 2005. Greenwood JS, Fabian MR, White KA, Mullen RT. 2005. Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway [190].** (C) ILVs dérivés de la membrane externe des mitochondries de cellules de feuilles de *Chenopodium quinoa* infectées par le *Carnation Italian ringspot virus* (CIRV). Les flèches indiquent des exemples de structures de type vésicule / sphérule distinctes situées dans l'espace intermembranaire. **Adapté de Yeen Ting Hwang et al., 2008. Localization of the carnation Italian ringspot virus replication protein p36 to the mitochondrial outer membrane is mediated by an internal targeting signal and the TOM complex [201].**

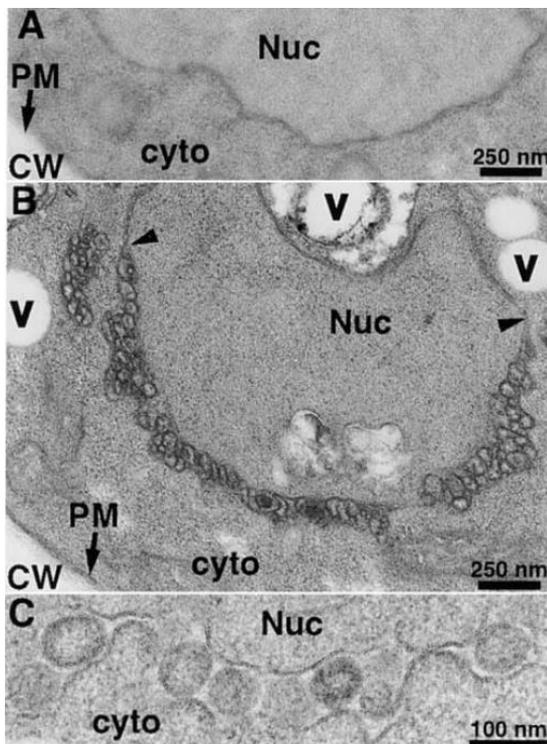


Figure 16 : Vésicules virales induites lors de l'infection du *Bromo mosaic virus*.

(A) Cellule de levure non infectée. (B et C) vésicules sphériques induites par le BMV invaginées dans la membrane périnucléaire de l'ER de la cellule de levure. Nuc: noyau; V: vacuole; PM: membrane plasmique; cyto: cytoplasme; CW: paroi cellulaire. **Adapté de Schwartz et al., 2002. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids [202].**

la réplication de l'ARN. Une étude plus approfondie révèle une interaction directe de SNF7 avec la protéine 1a [174]. Le BMV recrute également des protéines de la famille des RHPs (Retuculon Homology domain Proteins). Ces protéines sont impliquées dans la formation de compartiments qui diffèrent de la forme sphérique tel que le ER ou le GA [206,207]. La suppression de trois protéines RHP les plus exprimées dans les cellules : RTN1, RTN2 et YOP1 réduisent la réplication du BMV [208]. Une résistance génétique du melon au *Cucumber mosaic virus* (CMV, genre *Cucumovirus*, famille *Bromoviridae*) a été caractérisée par un unique polymorphisme dans la protéine SNARE VPS41 induisant une réduction significative de l'accumulation de CMV [70]. Le rôle du complexe SNARE dans la réplication BMV n'est à ce jour pas connu.

Les modifications sur les endomembranes d'autres familles de virus de plantes ont été peu étudiées [209–211]. Les facteurs de l'hôtes et viraux impliqués dans ces mécanismes ne sont pas connus.

Objectifs de la thèse

Par une approche de cartographie génétique, *Amano et al.*, (2011) [212] ont identifié une région de résistance récessive au Potyvirus ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) chez le concombre. Ce locus appelé *zym*^{A192-18} code pour 6 gènes. Il a été montré sur l'accèsion de concombre résistante A192-18, la présence de mutations non-synonymes sur un seul des gènes candidats, celui codant pour la protéine VPS4. Les mutations F29S et M33I de la protéine VPS4 semblent être les responsables de la résistance au ZYMV chez le concombre [212].

Afin de transposer cette nouvelle résistance chez d'autres espèces, dans le **CHAPITRE II**, nous avons cherché des substitutions sur le gène *Vps4* chez d'autres espèces puis caractérisé leur résistance. Pour cela, dans un premier temps, nous avons étudié la conservation du gène codant pour VPS4 parmi les espèces de plantes, puis recherché la diversité intra-espèces chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* et les plantes d'intérêt agronomique *Solanum Lycopersicum* (Tomate) et *Cucumis melo* (melon). L'une des accessions identifiées portant un allèle de ce gène est TGR-1551. Cette accession est connue pour plusieurs résistances dont une résistance récessive au Potyvirus WMV (*Watermelon Mosaic Virus*) localisée par cartographie génétique sur le chromosome 11 [213]. Cette région génétique comprend une centaine de gènes candidats, dont le gène codant pour la protéine VPS4. Dans un second temps, nous avons phénotypé les accessions portant des substitutions non-synonymes sur le gène *Vps4* pour la résistance au ZYMV et WMV. Enfin, pour valider le rôle joué par les substitutions sur la résistance, nous avons employé deux approches de validations : (1) Par le phénotypage d'une collection EMS de melon et (2) par le contournement de la résistance en utilisant le WMV comme vecteur de l'allèle sauvage de *Vps4*.

VPS4 appartient au complexe protéique ESCRT qui est impliqué dans le trafic membranaire des cellules. Pour mieux comprendre les mécanismes associés à la résistance induite par les mutations sur la protéine VPS4, dans le **CHAPITRE III**, nous avons recherché des interactions entre les protéines virales du WMV et de l'ESCRT. Pour cela nous avons utilisé dans un premier temps un crible en double hybride de levure. Dans un second temps, nous avons validé une partie des interactions mise en évidence par une approche de Split-YFP en utilisant les protéines de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Dans le **CHAPITRE IV**, nous discutons de l'utilisation d'une nouvelle famille de gènes de résistance ainsi que d'un nouveau modèle de réplication des Potyvirus impliquant l'ESCRT à deux étapes essentielles.

Références :

- [1] ZOHARI D. The Origin and Early Spread of Agriculture in the Old World. vol. 16. Elsevier B.V.; 1986. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-42703-8.50006-3>.
- [2] Ellstrand NC, Prentice HC, F J. Domesticated plants into their wild relatives. *Annu Rev Ecol Syst* 1999;30:539–63.
- [3] Burney JA, Davis SJ, Lobell DB. Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:12052–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914216107>.
- [4] Pingali PL. Green revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:12302–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912953109>.
- [5] Popp, J., Hantos K. *STUDIES IN AGRICULTURAL ECONOMICS*. *Stud Agric Econ* 2011:47–66.
- [6] Caligari PDS, Forster BP. *Plant Breeding and Crop Improvement*. ELS John Wiley Sons 2015:1–8. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002024.pub2>.
- [7] Jauhar PP. Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: The prospects and challenges. *Crop Sci* 2006;46:1841–59. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.07-0223>.
- [8] Strange RN, Scott PR. Plant Disease: A Threat to Global Food Security. *Annu Rev Phytopathol* 2005;43:83–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>.
- [9] Oerke E-C. Crop losses to pests. *J Agric Sci* 2006;144:31. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>.
- [10] Dempewolf H, Baute G, Anderson J, Kilian B, Smith C, Guarino L. Past and future use of wild relatives in crop breeding. *Crop Sci* 2017;57:1070–82. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.10.0885>.
- [11] Bisognin DA. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciência Rural* 2002;32:715–23. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000400028>.
- [12] JEFFREY C. A review of the Cucurbitaceae. *Bot J Linn Soc* 1980;81:233–47. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1980.tb01676.x>.
- [13] Pozner R, Mennes CB, Wunderlin R, Lira R. *Cucurbitaceae* 2003.
- [14] Schaefer H, Renner SS, Schaefer H, Renner SS. Phylogenetic relationships in the order Cucurbitales and a new classification of the gourd family (Cucurbitaceae) Published by : International Association for Plant Taxonomy (IAPT) Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/41059827> Your use of the JSTO 2016;60:122–38. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.20.3948>.
- [15] Nee M. The Domestication of Cucurbita (Cucurbitaceae). *New York Bot Gard* 1990;44:56–68.
- [16] Pitrat M. Melon. *Biotechnol Agric For* 2007;60:209–40. https://doi.org/10.1007/978-3-540-49161-3_9.
- [17] Guo S, Zhao S, Sun H, Wang X, Wu S, Lin T, et al. Resequencing of 414 cultivated and wild watermelon accessions identifies selection for fruit quality traits. *Nat Genet* 2019;51:1616–23. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0518-4>.
- [18] Kerje T, Grum M. The origin of melon: A review of the literature. *Acta Horti* 2000;510:37–44.
- [19] Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, Gonzalez VM, et al. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:11872–7.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.1205415109>.
- [20] Zhao G, Lian Q, Zhang Z, Fu Q, He Y, Ma S, et al. A comprehensive genome variation map of melon identifies multiple domestication events and loci influencing agronomic traits. *Nat Genet* 2019;51:1607–15. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0522-8>.
- [21] Yalcin-Mendi NY, Ipek M, Serbest-Kobaner S, Curuk S, Kacar YA, Cetiner S, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. *Plant Cell Rep* 1990;160–4.
- [22] Guis M, Amor M Ben, Latché A, Pech JC, Roustan JP. A reliable system for the transformation of cantaloupe charentais melon (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis*) leading to a majority of diploid regenerants. *Sci Hortic (Amsterdam)* 2000;84:91–9. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00101-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00101-6).
- [23] Akasaka-Kennedy Y, Tomita KO, Ezura H. Efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Sci* 2004;166:763–9. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.020>.
- [24] Kintzios S, Sereti E, Bluchos P, Drossopoulos JB, Kitsaki CK, Liopa-Tsakalidis A. Growth regulator pretreatment improves somatic embryogenesis from leaves of squash (*Cucurbita pepo* L.) and melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Rep* 2002;21:1–8. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0448-x>.
- [25] Yalcin-Mendi NY, Ipek M, Serbest-Kobaner S, Curuk S, Aka Kacar Y, Cetiner S, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of “Kirkagac 637” a recalcitrant melon (*Cucumis melo* L.) cultivar with ZYMV coat protein encoding gene. *Eur J Hortic Sci* 2004;69:258–62.
- [26] Menéndez E, Marfa V, Claveria E, Martínez I, Pujol M, Dolcet-Sanjuan R. Selection of *Cucumis melo* L. subsp. *melo* “Piel de Sapo” lines with high efficiency in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Acta Hortic* 2012;929:423–8.
- [27] Pech JC, A. Bernadac, M. Bouzayen, A. Latche, Dogimont C, Pitrat M, et al. *Transgenic Crops V : Melon*. *Biotechnol Agric For* 2007;60.
- [28] Nuñez-Palenius HG, Gomez-Lim M, Ochoa-Alejo N, Grumet R, Lester G, Cantliffe DJ. Melon fruits: Genetic diversity, physiology, and biotechnology features. *Crit Rev Biotechnol* 2008;28:13–55. <https://doi.org/10.1080/07388550801891111>.
- [29] Chovelon V, Restier V, Giovinazzo N, Dogimont C, Aarrouf J. Histological study of organogenesis in *Cucumis melo* L. after genetic transformation: Why is it difficult to obtain transgenic plants? *Plant Cell Rep* 2011;30:2001–11. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1108-9>.
- [30] Gaba V., Schlarman E., Elman C., Sagee O., Watad A. A., Gray D. J. In vitro Studies on the Anatomy and Morphology of Bud Regeneration in Melon Cotyledons. *Soc Vitro Biol* 1999;35:1–7.
- [31] Liborio Stipp LC, Januzzi Mendes BM, Stefano Piedade SMD, Martinelli Rodriguez AP. In vitro morphogenesis of *Cucumis melo* var. *inodorus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2001;65:81–9. <https://doi.org/10.1023/A:1010684922210>.
- [32] Adelberg JW, Rhodes BB, Skorupska HT, Bridges WC. Explant origin affects the frequency of tetraploid plants from tissue cultures of melon. *HortScience* 1994;29:689–92. <https://doi.org/10.21273/hortsci.29.6.689>.
- [33] Guis M, Botondi R, Ben-Amor M, Ayub R, Bouzayen M, Pech JC, et al. Ripening-associated biochemical traits of Cantaloupe Charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. *J Am Soc Hortic Sci* 1997;122:748–51.

- <https://doi.org/10.21273/jashs.122.6.748>.
- [34] Galperin M, Zelcer A, Kenigsbuch D. High Competence for Adventitious Regeneration in the BU-21/3 Melon Genotype Is Controlled by a Single Dominant Locus. *HortScience* 2003;38:1167–8. <https://doi.org/10.21273/hortsci.38.6.1167>.
- [35] Nuñez-Paleniús HG, Cantliffe DJ, Huber DJ, Ciardi J, Klee HJ. Transformation of a muskmelon “Galia” hybrid parental line (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Ser.) with an antisense ACC oxidase gene. *Plant Cell Rep* 2006;25:198–205. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0042-0>.
- [36] Bordas M, Montesinos C, Dabauza M, Salvador A, Roig LA, Serrano R, et al. Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to *Cucumis melo* L. cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance. *Transgenic Res* 1997;6:41–50. <https://doi.org/10.1023/A:1018453032336>.
- [37] Çürük S, Çetiner S, Elman C, Xia X, Wang Y, Yeheskel A, et al. Transformation of recalcitrant melon (*Cucumis melo* L.) cultivars is facilitated by wounding with carborundum. *Eng Life Sci* 2005;5:169–77. <https://doi.org/10.1002/elsc.200520069>.
- [38] Castelblanque L, Marfa V, Claveria E, I M, L P-G, Dolcet-sanjuan R. Improving the genetic transformation efficiency of *Cucumis melo* subsp . *melo* “Piel de Sapo” via *Agrobacterium*. *Transformation* 2008:627–32.
- [39] Henikoff S, Till BJ, Comai L, Division BS, Hutchinson F, Washington SH. Perspectives on Translational Biology TILLING . Traditional Mutagenesis Meets Functional Genomics. *Cancer Res* 2004;135:630–6. <https://doi.org/10.1104/pp.104.041061.630>.
- [40] Dahmani-Mardas F, Troadec C, Boualem A, Lévêque S, Alsadon AA, Aldoss AA, et al. Engineering melon plants with improved fruit shelf life using the TILLING approach. *PLoS One* 2010;5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015776>.
- [41] Boualem A, Fergany M, Fernandez R, Troadec C, Martin A, Morin H, et al. A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons. *Science* (80-) 2008;321:836–8. <https://doi.org/10.1126/science.1159023>.
- [42] Martin A, Troadec C, Boualem A, Rajab M, Fernandez R, Morin H, et al. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature* 2009;461:1135–8. <https://doi.org/10.1038/nature08498>.
- [43] Boualem A, Troadec C, Kovalski I, Sari MA, Perl-Treves R, Bendahmane A. A conserved ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in two *Cucumis* species. *PLoS One* 2009;4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006144>.
- [44] Boualem A, Fleurier S, Troadec C, Audigier P, Kumar APK, Chatterjee M, et al. Development of a *Cucumis sativus* TILLING platform for forward and reverse genetics. *PLoS One* 2014;9:3–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097963>.
- [45] Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P. Emerging infectious diseases of plants: Pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol* 2004;19:535–44. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.021>.
- [46] Desbiez C, Lecoq H, Girard M, Cotillon AC, Schoen L. First Report of Cucurbit yellow stunting disorder virus in Commercial Cucumber Greenhouses in France . *Plant Dis* 2003;87:600–600. <https://doi.org/10.1094/pdis.2003.87.5.600c>.
- [47] Lecoq H, Desbiez C, Wipf-Scheibel C, Girard M. Potential involvement of melon fruit in the long distance dissemination of cucurbit potyviruses. *Plant Dis* 2003;87:955–9. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.8.955>.
- [48] Lecoq H, Desbiez C. Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region. An Ever-Changing Picture. vol. 84. 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00003->

- 8.
- [49] Whitham SA, Yang C, Goodin MM. Global impact: Elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant-Microbe Interact* 2006;19:1207–15. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1207>.
- [50] Sevik MA, Arli-Sokmen M. Viruses infecting cucurbits in Samsun, Turkey. *Plant Dis* 2003;87:341–4. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.4.341>.
- [51] Ling KS, Jackson DM, Harrison H, Simmons AM, Pesic-VanEsbroeck Z. Field evaluation of yield effects on the U.S.A. heirloom sweetpotato cultivars infected by Sweet potato leaf curl virus. *Crop Prot* 2010;29:757–65. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.02.017>.
- [52] McKirdy SJ, Jones RAC, Nutter FW. Quantification of yield losses caused by Barley yellow dwarf virus in wheat and oats. *Plant Dis* 2002;86:769–73. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.7.769>.
- [53] Nicaise V. Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. *Front Plant Sci* 2014;5:1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00660>.
- [54] Thresh JM. *Virus and Virus-like diseases of Major Crops in Developing Countries*. vol. 1. Springer; 2003. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-007-0791-7>.
- [55] Ng JCK, Perry KL. Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Mol Plant Pathol* 2004;5:505–11. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2004.00240.X>.
- [56] Whitfield AE, Falk BW, Rotenberg D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* 2015;479–480:278–89. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.026>.
- [57] H.E. Simmons, Dunham JP, Zinn KE, Munkvold GP, Holmes EC, Stephenson AG. Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus): Vertical transmission, seed infection and cryptic infections. *Virus Res* 2013;176:259–64. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.06.016>.
- [58] Rochon D. Fungal transmission of plant viruses. *Curr Protoc Microbiol* 2009:1–17. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc16b04s12>.
- [59] Métraux JP, Jackson RW, Schnettler E, Goldbach RW. Chapter 2 Plant Pathogens as Suppressors of Host Defense. *Adv Bot Res* 2009;51:39–89. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(09\)51002-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51002-6).
- [60] Zipfel C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2008;20:10–6. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.11.003>.
- [61] Bigeard J, Colcombet J, Hirt H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol Plant* 2015;8:521–39. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>.
- [62] Hurley B, Subramaniam R, Guttman DS, Desveaux D. Proteomics of effector-triggered immunity (ETI) in plants. *Virulence* 2014;5:752–60. <https://doi.org/10.4161/viru.36329>.
- [63] Qi Y, Tsuda K, Glazebrook J, Katagiri F. Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in Arabidopsis. *Mol Plant Pathol* 2011;12:702–8. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00704.x>.
- [64] Belkhadir Y, Subramaniam R, Dangl JL. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol* 2004;7:391–9. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.009>.
- [65] de Ronde D, Butterbach P, Kormelink R. Dominant resistance against plant viruses. *Front Plant Sci* 2014;5:1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00307>.
- [66] Han S, Heo K, Choi B, Seo J. Recessive Resistance : Developing Targets for Genome

- Editing to Engineer Viral Disease Resistant Crops 2019;25:49–61.
- [67] Diaz-Pendon JA, Truniger V, Nieto C, Garcia-Mas J, Bendahmane A, Aranda MA. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Mol Plant Pathol* 2004;5:223–33. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00223.x>.
- [68] Truniger V, Aranda MA. AVR vol 75 chap III - Recessive Resistance to Plant Viruses. vol. 75. Elsevier; 2009. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(09\)07504-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)07504-6).
- [69] Dogimont C. 2011 Gene List for Melon. *Cucurbit Genet Coop Rep* 33-34 2011;133:104–33.
- [70] Giner A, Pascual L, Bourgeois M, Gyetvai G, Rios P, Picó B, et al. A mutation in the melon Vacuolar Protein Sorting 41 prevents systemic infection of Cucumber mosaic virus. *Sci Rep* 2017;7:10471. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10783-3>.
- [71] Nieto C, Piron F, Dalmais M, Marco CF, Moriones E, Gómez-Guillamón ML, et al. EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biol* 2007;7:1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-34>.
- [72] Brotman Y, Normantovich M, Goldenberg Z, Zvirin Z, Kovalski I, Stovbun N, et al. Dual resistance of melon to fusarium oxysporum races 0 and 2 and to papaya ring-spot virus is controlled by a pair of head-to-head-oriented nb-lrr genes of unusual architecture. *Mol Plant* 2013;6:235–8. <https://doi.org/10.1093/mp/sss121>.
- [73] Lecoq H, Dafalla GA, Mohamed YF, Ali HM, Wipt- Scheibe C, Desbiez C, et al. Survey of Virus Diseases Infecting Cucurbit Crops in Eastern, Central and Western Sudan. vol. 2. 1994. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [74] Buck KW. COMPARISON OF THE REPLICATION OF POSITIVE-STRANDED RNA VIRUSES OF PLANTS AND ANIMALS. *Adv Virus Res* 1996;47:159–251.
- [75] Sanfaçon H. Replication of positive-strand RNA viruses in plants: contact points between plant and virus components. *Can J Bot* 2005;83:1529–49. <https://doi.org/10.1139/b05-121>.
- [76] Shaw JG. Tobacco mosaic virus and the study of early events in virus infections. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 1999;354:603–11. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0412>.
- [77] Laliberté J-F, Zheng H. Viral Manipulation of Plant Host Membranes. *Annu Rev Virol* 2014;1:237–59. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085532>.
- [78] Pitzalis N, Heinlein M. The roles of membranes and associated cytoskeleton in plant virus replication and cell-to-cell movement. *J Exp Bot* 2017;69:117–32. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx334>.
- [79] Hyodo K, Okuno T. Host factors used by positive-strand RNA plant viruses for genome replication. *J Gen Plant Pathol* 2014;80:123–35. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0505-7>.
- [80] Noueiry AO, Ahlquist P. BROME MOSAIC VIRUS RNA REPLICATION : Revealing the Role of the Host in RNA Virus Replication. *Annu Rev Phytopathol* 2003;41:77–98. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095717>.
- [81] Ahlquist P, O. AN, Lee W-M, Kushner DB, Dye BT, Noueiry AO, et al. Host Factors in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication. *J Virol* 2003;77:8181–6. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.15.8181>.
- [82] Bedard KM, Semler BL. Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes Infect* 2004;6:702–13. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.03.001>.
- [83] Gale M, Tan S-L, Katze MG. Translational Control of Viral Gene Expression in Eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:239–80.

- <https://doi.org/10.1128/membr.64.2.239-280.2000>.
- [84] Dreher TW, Miller WA. Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology* 2006;344:185–97. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.031>.
- [85] Dufresne PJ, Cotton S, Thivierge K, Gall O Le, Fortin MG. Plant Virus RNAs . Coordinated Recruitment of Conserved Host Functions by (+) ssRNA Viruses during Early Infection Events 2005;138:1822–7. <https://doi.org/10.1104/pp.105.064105.1822>.
- [86] Westhof E, Jaeger L. RNA pseudoknots. *Curr Opin Struct Biol* 1992;2:327–33.
- [87] Pollack JR, Ganem D. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. *J Virol* 1993;67:3254–63. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.6.3254-3263.1993>.
- [88] Tzeng TH, Tu CL, Bruenn JA. Ribosomal frameshifting requires a pseudoknot in the *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus. *J Virol* 1992;66:999–1006. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.2.999-1006.1992>.
- [89] Kadaré G, Haenni A-L. Virus-Encoded RNA Helicases. *J Virol* 1997;71:2583–90.
- [90] Osman TA, Buck KW. Complete replication in vitro of tobacco mosaic virus RNA by a template-dependent, membrane-bound RNA polymerase. *J Virol* 1996;70:6227–34. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.9.6227-6234.1996>.
- [91] Oana D, Ziegler A, Torrance L, Gasemi S, Danci M. Potyviridae Family – short review. *J Horticult For Biotechnol* 2009;13:410–21.
- [92] Elizabeth L. Pettit Kneller, Rakotondrafarab AM, Miller WA. Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Res* 2006;119:63–75. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- [93] Chung BYWY-W, Miller WA, Atkins JF, Firth AE. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:5897–902. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800468105>.
- [94] White KA. The polymerase slips and PIPO exists . *EMBO Rep* 2015;16:885–6. <https://doi.org/10.15252/embr.201540871>.
- [95] Zamora M, Méndez-López E, Agirrezabala X, Cuesta R, Lavín JL, Amelia Sánchez-Pina M, et al. Potyvirus virion structure shows conserved protein fold and RNA binding site in ssRNA viruses. *Sci Adv* 2017;3:1–8. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao2182>.
- [96] Revers F, García JA. Molecular biology of potyviruses. vol. 92. 1st ed. Elsevier Inc.; 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.006>.
- [97] Li XH, Valdez P, Olvera RE, Carrington JC. Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *J Virol* 1997;71:1598–607. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.2.1598-1607.1997>.
- [98] Fellers J, Wan J, Hong Y, Collins GB, Hunt AG. In vitro interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* 1998;79:2043–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-8-2043>.
- [99] Schaad MC, Haldeman-Cahill R, Cronin S, Carrington JC. Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J Virol* 1996;70:7039–48. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.10.7039-7048.1996>.
- [100] Xiong R, Wang A. SCE1, the SUMO-Conjugating Enzyme in Plants That Interacts with NIb, the RNA-Dependent RNA Polymerase of Turnip Mosaic Virus, Is Required for Viral Infection. *J Virol* 2013;87:4704–15. <https://doi.org/10.1128/jvi.02828-12>.

- [101] Fernández A, García JA. The RNA helicase CI from plum pox potyvirus has two regions involved in binding to RNA. *FEBS Lett* 1996;388:206–10. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00571-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00571-6).
- [102] Tilsner J, Oparka KJ. Missing links? - The connection between replication and movement of plant RNA viruses. *Curr Opin Virol* 2012;2:705–11. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.09.007>.
- [103] Niehl A, Heinlein M. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 2011;248:75–99. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0246-1>.
- [104] Fernández A, Guo HS, Sáenz P, Simón-Buela L, Cedrón MG de, García JA. The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4474–80. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4474>.
- [105] Wei T, Zhang C, Hong J, Xiong R, Kasschau KD, Zhou X, et al. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog* 2010;6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000962>.
- [106] Schaad MC, Jensen PE, Carrington JC. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* 1997;16:4049–59. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.4049>.
- [107] Restrepo-Hartwig M a, Carrington JC. The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *J Virol* 1994;68:2388–97. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.4.2388-2397.1994>.
- [108] Waltermann A, Maiss E. Detection of 6K1 as a mature protein of 6 kDa in plum pox virus-infected *Nicotiana benthamiana*. *J Gen Virol* 2006;87:2381–6. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81873-0>.
- [109] Cui H, Wang A. Plum Pox Virus 6K1 Protein Is Required for Viral Replication and Targets the Viral Replication Complex at the Early Stage of Infection. *J Virol* 2016;90:5119–31. <https://doi.org/10.1128/JVI.00024-16>.
- [110] Vijayapalani P, Maeshima M, Nagasaki-Takekuchi N, Miller WA. Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathog* 2012;8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002639>.
- [111] Plisson C, Drucker M, Blanc S, German-Retana S, Le Gall O, Thomas D, et al. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *J Biol Chem* 2003;278:23753–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302512200>.
- [112] Rojas MR, Zerbini FM, Allison RF, Gilbertson RL, Lucas WJ. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* 1997;237:283–95. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8777>.
- [113] Del Toro F, Fernández FT, Tilsner J, Wright KM, Tenllado F, Chung BN, et al. Potato virus Y HCPro localization at distinct, dynamically related and environment-influenced structures in the cell cytoplasm. *Mol Plant-Microbe Interact* 2014;27:1331–43. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-14-0155-R>.
- [114] Haikonen T, Rajamäki ML, Valkonen JPT. Interaction of the microtubule-associated host protein HIP2 with viral helper component proteinase is important in infection with Potato virus A. *Mol Plant-Microbe Interact* 2013;26:734–44. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-13-0023-R>.
- [115] Cheng YQ, Liu ZM, Xu J, Zhou T, Wang M, Chen YT, et al. HC-Pro protein of sugar cane mosaic virus interacts specifically with maize ferredoxin-5 in vitro and in planta. *J Gen*

- Virol* 2008;89:2046–54. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/001271-0>.
- [116] Valli A, Gallo A, Calvo M, Perez J d. J, Garcia JA. A Novel Role of the Potyviral Helper Component Proteinase Contributes To Enhance the Yield of Viral Particles. *J Virol* 2014;88:9808–18. <https://doi.org/10.1128/jvi.01010-14>.
- [117] Anindya R, Savithri HS. Surface-exposed amino- and carboxy-terminal residues are crucial for the initiation of assembly in Pepper vein banding virus: A flexuous rod-shaped virus. *Virology* 2003;316:325–36. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00593-2](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00593-2).
- [118] Ivanov KI, Puustinen P, Gabrenaite R, Vihinen H, Rönstrand L, Valmu L, et al. Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection. *Plant Cell* 2003;15:2124–39. <https://doi.org/10.1105/tpc.012567>.
- [119] Pérez J de J, Udeshi ND, Shabanowitz J, Ciordia S, Juárez S, Scott CL, et al. O-GlcNAc modification of the coat protein of the potyvirus Plum pox virus enhances viral infection. *Virology* 2013;442:122–31. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.03.029>.
- [120] Verchot J, Koonin E V., Carrington JC. The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 1991;185:527–35. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90522-D](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90522-D).
- [121] Verchot J, Carrington JC. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J Virol* 1995;69:3668–74. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.6.3668-3674.1995>.
- [122] Soumounou Y, Laliberte JF. Nucleic acid-binding properties of the P1 protein of turnip mosaic potyvirus produced in *Escherichia coli*. *J Gen Virol* 1994;75:2567–73. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-10-2567>.
- [123] López L, Urzainqui A, Domínguez E, García JA. Identification of an N-terminal domain of the plum pox potyvirus CI RNA helicase involved in self-interaction in a yeast two-hybrid system. *J Gen Virol* 2001;82:677–86. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-3-677>.
- [124] Martinez F, Daros J-A. Tobacco etch virus Protein P1 Traffics to the Nucleolus and Associates with the Host 60S Ribosomal Subunits during Infection. *J Virol* 2014;88:10725–37. <https://doi.org/10.1128/jvi.00928-14>.
- [125] Jenner CE, Wang X, Tomimura K, Ohshima K, Ponz F, Walsh JA. The dual role of the potyvirus P3 protein of Turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in brassicas. *Mol Plant-Microbe Interact* 2003;16:777–84. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.9.777>.
- [126] Suehiro N, Natsuaki T, Watanabe T, Okuda S. An important determinant of the ability of Turnip mosaic virus to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *J Gen Virol* 2004;85:2087–98. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79825-0>.
- [127] Riechmann JL, Cervera MT, Garcia JA. Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *J Gen Virol* 1995;76:951–6. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-951>.
- [128] Rodriguez-Cerezo E, Ammar ED, Pirone TP, Shaw JG. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *J Gen Virol* 1993;74:1945–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-9-1945>.
- [129] Bonifacino JS, Glick BS. Review : The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* 2004;116:153–66.
- [130] Yuxiang Ji, Meng Z, Shanjin H. Plant Protein Secretion: Methods and Protocols.

- Methods Mol Biol 2017;1662:1–284. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7262-3>.
- [131] Ettema TJG, Bernander R. Cell division and the ESCRT complex: A surprise from the archaea. *Commun Integr Biol* 2009;2:86–8. <https://doi.org/10.4161/cib.7523>.
- [132] Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Neurobiol Commun* by Peter B Moore 1998;95:15781–6.
- [133] Lord C, Ferro-Novick S, Miller EA. The highly conserved COPII coat complex sorts cargo from the endoplasmic reticulum and targets it to the Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013367>.
- [134] Christ L, Raiborg C, Wenzel EM, Campsteijn C, Stenmark H. Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. *Trends Biochem Sci* 2017;42:42–56. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.08.016>.
- [135] Hurley JH, Emr SD. THE ESCRT COMPLEXES: Structure and Mechanism of a Membrane-Trafficking Network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2006;35:277–98. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.102126>.
- [136] Hwang I, Robinson DG. Transport vesicle formation in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* 2009;12:660–9. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.09.012>.
- [137] Hsu VW, Lee SY, Yang JS. The evolving understanding of COPI vesicle formation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:360–4. <https://doi.org/10.1038/nrm2663>.
- [138] Matsuoka K, Orci L, Amherdt M, Bednarek SY, Hamamoto S, Schekman R, et al. COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* 1998;93:263–75. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81577-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81577-9).
- [139] Bor LT, Wang Y, Yan SO, Hong W. COPII and exit from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2005;1744:293–303. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.02.007>.
- [140] Béthune J, Wieland FT. Assembly of COPI and COPII Vesicular Coat Proteins on Membranes. *Annu Rev Biophys* 2018;47:1–21. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-033259>.
- [141] Barlowe C. COPII: a membrane coat that forms endoplasmic reticulum-derived vesicles. *FEBS Lett* 1995;369:93–6. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00618-J](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00618-J).
- [142] Faso C, Chen Y-N, Tamura K, Held M, Zemelis S, Marti L, et al. A Missense Mutation in the Arabidopsis COPII Coat Protein Sec24A Induces the Formation of Clusters of the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus. *Plant Cell* 2009;21:3655–71. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068262>.
- [143] Seaman MNJ, Michael McCaffery J, Emr SD. A Membrane Coat Complex Essential for Endosome-to-Golgi Retrograde Transport in Yeast. *J Cell Biol* 1998;142:665–81. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.3.665>.
- [144] Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J* 2011;30:3481–500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>.
- [145] Jahn R, Scheller RH. SNAREs - Engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:631–43. <https://doi.org/10.1038/nrm2002>.
- [146] Takemoto K, Ebine K, Askani JC, Krüger F, Gonzalez ZA, Ito E, et al. Distinct sets of tethering complexes, SNARE complexes, and Rab GTPases mediate membrane fusion at the vacuole in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* 2018:201717839.
- [147] Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2014;29:116–25. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>.

- [148] Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, et al. Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Dev Cell* 2011;20:131–9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.003>.
- [149] Gao C, Zhuang X, Shen J, Jiang L. Plant ESCRT Complexes: Moving Beyond Endosomal Sorting. *Trends Plant Sci* 2017;22:986–98. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.003>.
- [150] Fader CM, Colombo MI. Autophagy and multivesicular bodies: Two closely related partners. *Cell Death Differ* 2009;16:70–8. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.168>.
- [151] Kinoshita T, Yip KW, Spence T, Liu FF. MicroRNAs in extracellular vesicles: Potential cancer biomarkers. *J Hum Genet* 2017;62:67–74. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.87>.
- [152] Bowers K, Lottridge J, Helliwell SB, Goldthwaite LM, Luzio JP, Stevens TH. Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 2004;5:194–210. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00169.x>.
- [153] Reyes FC, Buono RA, Roschztardt H, Di Rubbo S, Yeun LH, Russinova E, et al. A novel endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) component in *Arabidopsis thaliana* controls cell expansion and development. *J Biol Chem* 2014;289:4980–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.529685>.
- [154] Spitzer C, Reyes FC, Buono R, Sliwinski MK, Haas TJ, Otegui MS. The ESCRT-related CHMP1A and B proteins mediate multivesicular body sorting of auxin carriers in *Arabidopsis* and are required for plant development. *Plant Cell* 2009;21:749–66. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064865>.
- [155] Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD. The ESCRT Pathway. *Dev Cell* 2011;21:77–91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>.
- [156] Davies BA, Babst M, Katzmann DJ. Regulation of Vps4 during MVB Sorting and Cytokinesis. *Growth (Lakeland)* 2008;23:1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- [157] Piper RC, Katzmann DJ. Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:519–47. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123319>.
- [158] Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery. *Curr Biol* 2012;22:R116–20. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.028>.
- [159] Winter V, Hauser MT. Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *Trends Plant Sci* 2006;11:115–23. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.01.008>.
- [160] Leung KF, Dacks JB, Field MC. Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic* 2008;9:1698–716. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00797.x>.
- [161] Boualem A, Dogimont C, Bendahmane A. The battle for survival between viruses and their host plants. *Curr Opin Virol* 2016;17:32–8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.12.001>.
- [162] Elena SF, Rodrigo G. Towards an integrated molecular model of plant-virus interactions. *Curr Opin Virol* 2012;2:713–8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.09.004>.
- [163] Wang A. Dissecting the Molecular Network of Virus-Plant Interactions: The Complex Roles of Host Factors. *Annu Rev Phytopathol* 2015;53:45–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120001>.
- [164] Morita E, Sundquist WI. RETROVIRUS BUDDING. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:395–425. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.102350>.

- [165] Broniarczyk J, Pim D, Massimi P, Bergant M, Goździcka-Józefiak A, Crump C, et al. The VPS4 component of the ESCRT machinery plays an essential role in HPV infectious entry and capsid disassembly. *Sci Rep* 2017;7:45159. <https://doi.org/10.1038/srep45159>.
- [166] Kovalev N, Inaba JI, Li Z, Nagy PD. The role of co-opted ESCRT proteins and lipid factors in protection of tombusviral double-stranded RNA replication intermediate against reconstituted RNAi in yeast. *PLoS Pathog* 2017;13:1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006520>.
- [167] Nagy PD, Strating JRPM, van Kuppeveld FJM. Building Viral Replication Organelles: Close Encounters of the Membrane Types. *PLoS Pathog* 2016;12:6–11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005912>.
- [168] Jiang J, Laliberte J-F. Membrane Association for Plant Virus Replication and Movement. *Curr Res Top Plant Virol* 2016:1–335.
- [169] Löhmus A, Varjosalo M, Mäkinen K. Protein composition of 6K2-induced membrane structures formed during Potato virus A infection. *Mol Plant Pathol* 2016;17:943–58. <https://doi.org/10.1111/mpp.12341>.
- [170] Verchot J. Wrapping membranes around plant virus infection. *Curr Opin Virol* 2011;1:388–95. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.09.009>.
- [171] Laliberté J-F, Sanfaçon H. Cellular Remodeling During Plant Virus Infection. *Annu Rev Phytopathol* 2010;48:69–91. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114239>.
- [172] Nagy PD, Pogany J, Lin JY. How yeast can be used as a genetic platform to explore virus-host interactions: From “omics” to functional studies. *Trends Microbiol* 2014;22:309–16. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.003>.
- [173] Panavas T, Serviène E, Brasher J, Nagy PD. Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:7326–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502604102>.
- [174] Diaz A, Zhang J, Ollwerther A, Wang X, Ahlquist P. Host ESCRT proteins are required for bromovirus RNA replication compartment assembly and function. *PLoS Pathog* 2015;11:e1004742. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004742>.
- [175] Rapaport D. How does the TOM complex mediate insertion of precursor proteins into the mitochondrial outer membrane? *J Cell Biol* 2005;171:419–23. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507147>.
- [176] Cross LL, Ebeed HT, Baker A. Peroxisome biogenesis, protein targeting mechanisms and PEX gene functions in plants. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2016;1863:850–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.027>.
- [177] Barajas D, Jiang Y, Nagy PD. A unique role for the host ESCRT proteins in replication of Tomato bushy stunt virus. *PLoS Pathog* 2009;5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000705>.
- [178] Richardson LGL, Clendening EA, Sheen H, Gidda SK, White KA, Mullen RT. A Unique N-Terminal Sequence in the Carnation Italian ringspot virus p36 Replicase-Associated Protein Interacts with the Host Cell ESCRT-I Component Vps23. *J Virol* 2014;88:6329–44. <https://doi.org/10.1128/JVI.03840-13>.
- [179] Wei T, Huang T-S, McNeil J, Laliberte J-F, Hong J, Nelson RS, et al. Sequential Recruitment of the Endoplasmic Reticulum and Chloroplasts for Plant Potyvirus Replication. *J Virol* 2010;84:799–809. <https://doi.org/10.1128/JVI.01824-09>.
- [180] Wei T, Wang A. Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent

- manner. *J Virol* 2008;82:12252–64. <https://doi.org/10.1128/JVI.01329-08>.
- [181] Jiang J, Patarroyo C, Garcia Cabanillas D, Zheng H, Laliberté J-F. The Vesicle-Forming 6K 2 Protein of Turnip Mosaic Virus Interacts with the COPII Coatmer Sec24a for Viral Systemic Infection. *J Virol* 2015;89:6695–710. <https://doi.org/10.1128/JVI.00503-15>.
- [182] Grangeon R, Cotton S, Laliberté J-F. A model for the biogenesis of Turnip mosaic virus replication factories. *Commun Integr Biol* 2010;3:363–5. <https://doi.org/10.4161/cib.3.4.11968>.
- [183] Wei T, Zhang C, Hou X, Sanfaçon H, Wang A. The SNARE Protein Syp71 Is Essential for Turnip Mosaic Virus Infection by Mediating Fusion of Virus-Induced Vesicles with Chloroplasts. *PLoS Pathog* 2013;9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003378>.
- [184] Wan J, Basu K, Mui J, Vali H, Zheng H, Laliberté J-F. Ultrastructural Characterization of Turnip Mosaic Virus-Induced Cellular Rearrangements Reveals Membrane-Bound Viral Particles Accumulating in Vacuoles. *J Virol* 2015;89:12441–56. <https://doi.org/10.1128/jvi.02138-15>.
- [185] Garcia CD, Jiang J, Movahed N, Germain H, Yasuyuki Yamaji HZ, Laliberté J-F. Turnip mosaic virus uses the snare protein vti11 in an unconventional route for replication vesicle trafficking. *Plant Cell* 2018;30:2594–615. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00281>.
- [186] Movahed N, Cabanillas DG, Wan J, Vali H, Laliberté JF, Zheng H. Turnip mosaic virus components are released into the extracellular space by vesicles in infected leaves. *Plant Physiol* 2019;180:1375–88. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00381>.
- [187] Wan J, Laliberté JF. Membrane-associated virus replication complexes locate to plant conducting tubes. *Plant Signal Behav* 2015;10. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1042639>.
- [188] Navarro B, Russo M, Pantaleo V, Rubino L. Cytological analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells supporting cymbidium ringspot virus defective interfering RNA replication. *J Gen Virol* 2006;87:705–14. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81325-0>.
- [189] Panavas T, Hawkins CM, Panaviene Z, Nagy PD. The role of the p33:p33/p92 interaction domain in RNA replication and intracellular localization of p33 and p92 proteins of Cucumber necrosis tomosvirus. *Virology* 2005;338:81–95. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.04.025>.
- [190] McCartney AW, Greenwood JS, Fabian MR, White KA, Mullen RT. Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *Plant Cell* 2005;17:3513–31. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036350>.
- [191] Titorenko VI, Rachubinski RA. The peroxisome: Orchestrating important developmental decisions from inside the cell. *J Cell Biol* 2004;164:641–5. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312081>.
- [192] Gunawardene CD, Donaldson LW, White KA. Tombusvirus polymerase: Structure and function. *Virus Res* 2017;234:74–86. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.012>.
- [193] Fernández de Castro I, Fernández JJ, Barajas D, Nagy PD, Risco C. Three-dimensional imaging of the intracellular assembly of a functional viral RNA replicase complex. *J Cell Sci* 2017;130:260–8. <https://doi.org/10.1242/jcs.181586>.
- [194] Jonczyk M, Pathak KB, Sharma M, Nagy PD. Exploiting alternative subcellular location for replication: Tombusvirus replication switches to the endoplasmic reticulum in the absence of peroxisomes. *Virology* 2007;362:320–30. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.01.004>.

- [195] Weber-Lotfi F, Dietrich A, Russo M, Rubino L. Mitochondrial Targeting and Membrane Anchoring of a Viral Replicase in Plant and Yeast Cells. *J Virol* 2002;76:10485–96. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.20.10485-10496.2002>.
- [196] Turner KA, Sit TL, Callaway AS, Allen NS, Lommel SA. Red clover necrotic mosaic virus replication proteins accumulate at the endoplasmic reticulum. *Virology* 2004;320:276–90. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.12.006>.
- [197] Barajas D, Martín IF de C, Pogany J, Risco C, Nagy PD. Noncanonical Role for the Host Vps4 AAA+ ATPase ESCRT Protein in the Formation of Tomato Bushy Stunt Virus Replicase. *PLoS Pathog* 2014;10:24–32. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004087>.
- [198] Sasvari Z, Kovalev N, Gonzalez PA, Xu K, Nagy PD. Assembly-hub function of ER-localized SNARE proteins in biogenesis of tombusvirus replication compartment. vol. 14. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007028>.
- [199] Barajas D, Nagy PD. Ubiquitination of tombusvirus p33 replication protein plays a role in virus replication and binding to the host Vps23p ESCRT protein. *Virology* 2010;397:358–68. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.010>.
- [200] Feng Z, Xu K, Kovalev N, Nagy PD. Recruitment of Vps34 PI3K and enrichment of PI3P phosphoinositide in the viral replication compartment is crucial for replication of a positive-strand RNA virus 2019:1–30.
- [201] Hwang YT, McCartney AW, Gidda SK, Mullen RT. Localization of the carnation Italian ringspot virus replication protein p36 to the mitochondrial outer membrane is mediated by an internal targeting signal and the TOM complex. *BMC Cell Biol* 2008;9:1–26. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-9-54>.
- [202] Schwartz M, Chen J, Janda M, Sullivan M, Den Boon J, Ahlquist P. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol Cell* 2002;9:505–14. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00474-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00474-4).
- [203] Bamunusinghe D, Seo J-K, Rao ALN. Subcellular Localization and Rearrangement of Endoplasmic Reticulum by Brome Mosaic Virus Capsid Protein. *J Virol* 2011;85:2953–63. <https://doi.org/10.1128/jvi.02020-10>.
- [204] Liu L, Westler WM, Den Boon JA, Wang X, Diaz A, Steinberg HA, et al. An amphipathic α -helix controls multiple roles of brome mosaic virus protein 1a in RNA replication complex assembly and function. *PLoS Pathog* 2009;5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000351>.
- [205] den Boon JA, Chen J, Ahlquist P. Identification of Sequences in Brome Mosaic Virus Replicase Protein 1a That Mediate Association with Endoplasmic Reticulum Membranes. *J Virol* 2001;75:12370–81. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.24.12370-12381.2001>.
- [206] Voeltz GK, Prinz WA, Shibata Y, Rist JM, Rapoport TA. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* 2006;124:573–86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.047>.
- [207] Diaz A, Ahlquist P. Role of host reticulon proteins in rearranging membranes for positive-strand RNA virus replication. *Curr Opin Microbiol* 2012;15:519–24. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.007>.
- [208] Diaz A, Wang X, Ahlquist P. Membrane-shaping host reticulon proteins play crucial roles in viral RNA replication compartment formation and function. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:16291–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011105107>.
- [209] Cao X, Jin X, Zhang X, Li Y, Wang C, Wang X, et al. Morphogenesis of Endoplasmic

- Reticulum Membrane-Invaginated Vesicles during Beet Black Scorch Virus Infection: Role of Auxiliary Replication Protein and New Implications of Three-Dimensional Architecture. *J Virol* 2015;89:6184–95. <https://doi.org/10.1128/jvi.00401-15>.
- [210] Han S, Sanfaçon H. Tomato Ringspot Virus Proteins Containing the Nucleoside Triphosphate Binding Domain Are Transmembrane Proteins That Associate with the Endoplasmic Reticulum and Cofractionate with Replication Complexes. *J Virol* 2003;77:523–34. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.1.523-534.2003>.
- [211] Hatta T, Bullivant S, Matthews R. Fine Structure of Vesicles Induced in Chloroplasts of Chinese Cabbage Leaves by Infection with Turnip Yellow Mosaic Virus 1973.
- [212] Amano M, Mochizuki A, Kawagoe Y, Iwahori K, Niwa K, Svoboda J, et al. High-resolution mapping of *zym*, a recessive gene for Zucchini yellow mosaic virus resistance in cucumber. *Theor Appl Genet* 2013;126:2983–93. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2187-5>.
- [213] Palomares-Rius FJ, Viruel MA, Yuste-Lisbona FJ, Lopez-Sese AI, Gomez-Guillamon ML. Simple sequence repeat markers linked to QTL for resistance to Watermelon mosaic virus in melon. *Theor Appl Genet* 2011;123:1207–14. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1660-2>.

CHAPITRE II

CARACTERISATION D'UN ALLELE DE VPS4 APPORTANT LA RESISTANCE AU WMV CHEZ LE MELON

Introduction

Les Potyvirus sont responsables de pertes significatives de rendement dans les cultures [1,2]. Le melon appartenant à la famille des *Cucurbitaceae* et au genre *Cucumis* qui sont particulièrement sensibles aux Potyvirus [3]. Les virus de cette famille impactant le plus les cultures de *Cucurbitaceae* sont le *Watermelon mosaic virus* (WMV), le *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) et *Papaya ringspot virus* (PRSV) [4]. Le gène le plus utilisée pour le développement de plantes résistantes aux Potyvirus est codé par le gène *eIF4e* [5,6]. Cependant aucun allèle résistant du gène *eIF4e* n'a été identifié pour la résistance à cette famille de virus chez le melon. Des gènes dominants de résistance sont connus vis-à-vis des Potyvirus ZYMV et PRSV, les gènes *Zym* et *Prv* ; ce dernier a été cloné et code pour une protéine de la famille des CC-NBS-LRR [7,8]. Cependant, bien que quelques accessions résistantes au WMV aient été identifiées, le ou les gènes responsables ne sont pas connus [9,10].

Chez le concombre, un *Cucurbitaceae* du genre *Cucumis*, Amano et al. (2013) ont identifié un allèle du gène codant pour la protéine VPS4 impliqué dans la résistance aux Potyvirus ZYMV [11]. La résistance récessive est portée par la présence des substitutions F29S et M33I sur le domaine MIT de VPS4. Cette protéine est impliquée dans la formation du corps multivésiculaire (MVB) dans les cellules eucaryotes [12]. VPS4 et le complexe ESCRT sont essentiels à la formation des vésicules lumineales des MBVs permettant le recyclage des protéines et molécules membranaires [13]. Le rôle de l'ESCRT la réplication virale a également été mis en évidence pour des virus à ARNs(+) d'animaux et pour les virus de plantes tel que le *Tombusvirus* TBSV ou le *Bromovirus* BMV [14,15]. Les Potyvirus, comme la plupart des virus à ARNs(+), utilisent les membranes des compartiments cellulaires pour former des vésicules virales. Ces dernières jouent un rôle essentiel dans la réplication des virus en abritant les complexes de réplifications viraux (VRC) des défenses cellulaires et en concentrant dans un espace réduit les mécanismes de réplication du génome viral [16–18]. Des études récentes semblent également montrer le déplacement des génomes viraux et des VRC d'une cellule de plante à une autre sous la forme de vésicules [19].

La biologie translationnelle a pour principe d'utiliser les connaissances acquises sur un gène chez une espèce pour identifier et caractériser un homologue dans une autre espèce [20]. Ainsi, afin de caractériser une nouvelle résistance au ZYMV portée par le gène *Vps4*, nous avons étudié le niveau de conservation de ce gène au cours de l'évolution. Nous avons par la suite recherché de la diversité intra-espèces pour le gène *Vps4* sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et les plantes d'intérêts agronomiques *Solanum lycopersicum* (tomate) et *Cucumis melo* (melon). Pour mesurer l'impact des substitutions sur le gène *Vps4* porté par les accessions de ces espèces, nous avons réalisé un phénotypage pour la résistance aux Potyvirus ZYMV.

L'une des accessions de melon identifiées portant une substitution pour le gène *Vps4* est également caractérisée comme résistante au Potyvirus WMV. Cette résistance a été cartographiée sur une région génétique sur laquelle le gène *Vps4* est présent [21]. Ainsi, nous phénotypons également ces accessions pour la résistance au WMV. Afin de démontrer le rôle joué par ces substitutions dans la résistance au virus, nous avons mis en place deux stratégies : (1) le phénotypage pour la résistance au ZYMV et WMV de familles mutagénisées sur le gène *Vps4* du melon et, (2) l'utilisation du WMV comme vecteur du gène *Vps4* pour contourner la résistance chez les accessions résistantes.

Matériels et Méthodes

Matériel variétal

La diversité naturelle de melon utilisée dans ce projet provient du Centre de Ressources Biologique « Légumes » (CRB-Leg). Les principales variétés utilisées sont Charentais Monoïque, Pastis 1, PI 414723, PI 161375, TGR-1551, IVT 2365, PI 482398, PI 482399, Humaid 93-4, Humaid 93-10, HSD 2441, HSD 2445, HSD 2446, HSD 2447 et HSD 2458. Par ailleurs, une collection de 652 accessions de melons représentatifs de la diversité génétique de l'espèce, dont l'ADN avait été préalablement extrait, a été utilisée pour le séquençage NGS. Les familles de melon mutagénisées à l'EMS sont issues de l'accession Charentais Monoïque [22]. Les familles M2, portant une mutation dans le gène d'intérêt identifiée par TILLING à l'IPS2, ont été semées, génotypées et autofécondées. L'accession de courgette Diamant a été utilisée comme hôte pour la réplication et le stockage des virus.

Conditions de cultures des plantes

Les semis ont été cultivés pendant 8 jours en serre. Les plants utilisés pour la multiplication et les croisements ont été maintenus en serre. Les plants qui ont été inoculés avec une souche virale ont été placés dans des chambres de culture sur une période jour/nuit de 14h/10h à 22°C/16°C. Les plants inoculés par les virus génétiquement modifiées ont été placés dans un laboratoire de niveau P3 sur une période jour/nuit de 14h/10h à 22°C/16°C.

Matériel viral et traitements

Les souches de virus utilisées pour ce travail sont WMV-fr, WMV-LLA1, WMV-LLA1-*Vps4*^{P30R}, WMV-LLA1-*Vps4*^{Wt} et ZYMV-R5A. Elles ont été multipliées en utilisant des plants de courgettes Diamant (Seminis). 14 dpi pour le ZYMV et 20 dpi pour le WMV, les feuilles ont été découpées en fines lamelles et rassemblées dans un échantillon de 1g. Les échantillons ont été stockés dans un environnement sec à 4°C. Les souches WMV-LLA1, WMV-LLA1-*Vps4*^{P30R} et WMV-LLA1-*Vps4*^{Wt} ont été stockées sous forme plasmidique dans la souche bactérienne *Escherichia coli* DH5α. L'inoculation des plantes à partir de feuilles sèches a été réalisée par contact mécanique [23].

Les feuilles ont été broyées dans un mortier avec pour 1 g de feuille fraîche ou desséchée, 4 ml de solution d'extraction (TEv), 0,5 g de charbon actif et 0,4 g de carborundum. L'inoculation des virus WMV-LLA1, WMV-LLA1-*Vps4*^{P30R} et WMV-LLA1-*Vps4*^{Wt} contenus dans un plasmide a été faite dans un premier temps par bombardement biolistique sur la courgette. Puis dans un second temps, les melons ont été infectés par inoculation mécanique en utilisant les tissus des courgettes infectées.

Matériel bactérien et traitements

Les souches de bactéries *Escherichia coli* DH5 α et StellarTM HST08 ont été utilisées pour le clonage et le stockage de plasmides. Les bactéries DH5a ont été rendu compétentes en suivant le protocole décrit dans *Y. Pang et al.*, (2017) [24]. La transformation des bactéries DH5 α et HST08[®] a été réalisée en suivant le protocole de transformation de bactéries thermocompétentes fourni par Clontech[®]. Une culture liquide de LB contenant les bactéries cultivées à 37°C pendant 24h a été utilisée pour l'extraction ADN et le stockage. L'extraction d'ADN a été réalisée en suivant le protocole du kit d'extraction Quiaprep[®] fourni par QuiagenTM. Le stockage a été réalisé en ajoutant du glycérol 50% à un volume 1:1 (Culture:Glycérol) avant congélation à une température de -80°C.

Notations des symptômes

Pour observer l'évolution de l'infection dans les tissus nouvellement formés et avant la floraison, l'inoculation du virus est réalisée au stade cotylédons étalés. Deux échelles de notations ont été mises en place en utilisant l'accession sensible aux WMV et ZYMV Charentais Monoïque (Figure notations WMV et ZYMV). Ces notations suivent une échelle qualitative en 4 paliers de symptômes foliaires (figure 17). Pour les virus ZYMV et WMV, le palier 0 relève de l'absence de symptômes sur la feuille à noter. Le palier 1 correspond à l'apparition de taches chlorotiques sur la feuille. Ce sont généralement les premiers symptômes observés suite à l'infection de Charentais Monoïque. Le second palier est marqué par l'apparition de mosaïques sur les feuilles et des premières cloques. Le palier 3 est caractérisé par une déformation, une taille réduite et un grand nombre de cloques sur la feuille.

A



0

1

2

3

Absence de
symptômes

Chlorose étalée
légère

Cloques et
développement
réduit

Développement
fortement réduit et
chlorose

B



0

1

2

3

Absence de
symptômes

Taches chlorotique
(≠ du jaunissement)

Mosaïque et
cloques

Développement
fortement réduit,
mosaïques et cloques

Figure 17 : Echelle de notations des symptômes viraux.

(A) Echelle de notations allant de 0 à 3 sur l'accession de melon Charentais Monoïque suite à l'infection avec le ZYMV. (B) Echelle de notations allant de 0 à 3 sur l'accession de melon Charentais Monoïque suite à l'infection avec le WMV.

Extraction d'ARN et amplification de l'ADNc

La séquence codante du gène MELO3C021413 codant pour la protéine VPS4 a été amplifiée depuis l'ADNc dérivé de l'ARNm isolé depuis les feuilles des accessions Charentais Monoïque et TGR-1551.

L'ARNm a été isolé en suivant le protocole adapté d'extraction d'ARN commercialisé par MRC. Les tissus ont été congelés dans l'azote liquide directement après le prélèvement. Le broyage des tissus a été réalisé par « Tissue Lyser ». L'ARN est stabilisé avec 1 mL pour 50 mg de tissus de PVP40 à 1%. La séparation des phases est faite à l'aide 200 µL de chloroforme par échantillons, 300 µL d'isopropanol et 200 µL de solution saline à 0.8 M sodium nitrate / 1.2 M chlorure sodium. L'ARN précipité est re-suspendu dans de l'H₂O RNA-free.

Les RT-PCR ont été réalisées en suivant le protocole du kit commercialisé par Invitrogen™. La retro-transcriptase SuperScript III® et les primers poly-T ont été utilisés pour générer l'ADNc. Les ADNc des gènes *CmVps4^{wt}* et *CmVps4^{P30R}* ont été amplifiées par PCR en suivant le protocole fourni par Agilent technology avec l'ADN polymérase Herculase. Les primers utilisés dans ce projet sont listés dans les tables S1 et S2. Les plasmides utilisés dans ce projet sont listés dans la table S3.

Transformation du WMV

La souche de levure *S. cerevisiae* YPH501 diploïde a été utilisée pour réaliser la transformation du WMV par recombinaison homologue. Le plasmide pYESTrp3-WMV contenant le génome du WMV a été linéarisé par l'enzyme de restriction NotI-HF® en suivant le protocole fourni par NEB. Les levures ont été cultivées dans le milieu de culture YPD jusqu'à atteindre une absorbance de 0.6 à 600nm. Les levures ont été centrifugées pour retirer le milieu de culture et re-suspendues avec 5 mL de SBEG. 1 µg de plasmide linéarisé, 3 µg d'ADNc, 7 µL d'ADN de sperme de saumon à 10 mg.mL⁻¹ et 800 µL de PEG 4000 ont été ajoutés à 100 µL du milieu contenant les levures. Le mix a été chauffé à 30°C pendant 1h. Le milieu a été retiré après centrifugation et les levures ont été re-suspendues avec 100 µL de milieu NB. Les levures ont étéensemencées sur du milieu sélectif CAU et incubées 48h à 30°C. Les plasmides utilisés dans ce projet sont listés dans la table S3.

Extraction d'ADN de levure

Les levures ont été mélangées avec des billes de verres, 200 µL de tampon d'extraction d'ADN de levure (TEy) et 200 µL de Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique (25:24:1) puis ont été vortexées pendant 5 minutes minimum. Après centrifugation la phase aqueuse contenant l'ADN a été récupérée. L'étape a été répétée avec 200 µL de Chloroforme/Alcool isoamylique (24:1). La précipitation de l'ADN est faite en ajoutant 20 µL d'Acétate de sodium (AcNa) 3,3 M et 550 µL d'éthanol >99% dans la phase aqueuse. Après 2h à 20°C l'échantillon est centrifugé et le surnageant éliminé. L'échantillon a été lavé à 2 reprises à l'éthanol 70% avant d'être re-suspendu dans 10 µL d'eau distillée.

Extraction ADN de plante

Les tissus ont été congelés dans l'azote liquide directement après le prélèvement. Le broyage des tissus a été réalisé par « Tissue Lyser ». 140 µL de tampons d'extraction (TEp) sont ajoutés et chauffés à 50°C pendant 10 minutes pour chaque échantillon. Les échantillons sont centrifugés et le surnageant contenant l'ADN est récupéré. Les échantillons sont précipités à l'aide de 120 µL d'isopropanol puis après centrifugation le surnageant est éliminé. Les culots sont lavés avec 400 µL d'éthanol puis à nouveau centrifugés pour éliminer le surnageant. L'ADN est re-suspendu avec 100 µL d'eau distillée.

Biologie moléculaire

Les PCR ont été réalisées en utilisant la polymérase GoTaq et en suivant le protocole fourni par Promega. Les extractions sur gel ont été réalisées en utilisant le kit d'extraction gel QIAquick® et le protocole fourni par QIAGEN. Les enzymes de restrictions utilisées sont NotI-HF®, Hpy188I et TaqI.

Solutions et milieux

Le milieu YPD liquide est composé de 1% d'extrait de levure, 2% de Bacto™ peptone et 2% de D-glucose. Pour obtenir le YPD solide il a été ajouté 2% de Bacto™ agar. Le milieu CAU liquide est composé de 0.67% « Yeast nitrogen base without amino acids » (Difco™), 0.1% de « Casamino acid » (Difco™), 2% de D-glucose et 2.5% d'Uracil (Flucka™). Pour obtenir le CAU solide, il a été ajouté 2% de Bacto™ agar. Le milieu Difco™ fourni par Thermo Fisher Scientific a été utilisé pour les cultures bactériennes.

Les antibiotiques de sélections utilisés pour le clonage sont la kanamycine et l'ampicilline dans les concentrations indiquées dans le protocole du fournisseur Sigma-Aldrich.

Le Tampon Extraction ADN plantes (TEp) est composé de Tris HCl pH7.5 à 200 mM, de NaCl 250 mM, de EDTA à 25 mM et de SDS à 0.5%. Le Tampon Extraction virus (TEv) est composé de Na₂HPO₄ 12H₂O à 75 mM et de Sodium NaS₂CN(C₂H₅)₂ 3H₂O à 10 mM. Le Tampon Extraction ADN de levures (TEy) est composé de NaCl à 100 mM, de Tris-HCl pH 8 à 10 mM, EDTA à 1 mM, du Triton X-100 à 2% (volume / volume), du SDS à 1% (poids / volume).

Le tampon SBEG est composé de Bicine pH8.5 à 10 mM, de Sorbitol à 1 M et d'Éthylène glycol à 3% (volume/volume). Le tampon NB est composé de NaCl à 0.15M et Bicine pH 8.35 à 10 mM. Le tampon PEG 4000 est composé de Bicine pH8.35 et du Poly-Éthylène glycol à 40% (volume/volume).

Tests ELISA

Pour chaque échantillon, 0.5 g des feuilles les plus jeunes a été prélevé et broyé à l'aide d'une presse à rouleaux. 4 mL de tampon d'extraction virus (TEv) ont été ajouté dans le broyat. Les tests ELISA ont été réalisés en suivant le protocole fourni par Agdia et les anticorps monoclonaux issus du kit « ELISA Reagent set for Potyvirus group (Poty) ». Les primers utilisés pour l'amplification lors des contrôles de génotypes sont listés dans les tables S1 et S2.

Séquençage NGS

Les amplifications sont réalisées sur les extraits de génome pour les 652 accessions. Le marquage est réalisé par une double PCR. Les primers utilisés dans la première amplification porte en 3' la séquence du gène cible et en 5' des séquences marqueur. 5 amplifications par génotype vont être amplifié pour couvrir l'ensemble du gène VPS4. Les séquences marqueurs sont associées en couple de primers forward et inward unique permettant de différencier chaque amplicon. Une seconde amplification utilisant des primers portant en 5' une séquence commune pour initier le séquençage et en 3' la séquence marqueur. Les séquences utilisées pour les primers sont listées dans les tables S1 et S2. La décompilation des données est réalisée à l'aide des séquences marqueurs. L'assemblage est réalisé par alignement des reads à l'aide de logiciel interne au GAFL.

Résultats

VPS4 est conservée chez les eucaryotes.

Afin d'explorer s'il est possible de transposer chez d'autres espèces la résistance au ZYMV identifiée chez le concombre, nous avons regardé le niveau de conservation de la protéine VPS4 chez différentes espèces de plantes. Pour cela, nous avons construit un arbre phylogénétique à partir des données protéiques disponibles dans la base de données NCBI (Figure 18). L'origine commune de ce gène remonte à l'ancêtre commun entre les *Eucaryotes* et les *Archaea* [25]. Le maintien du gène *Vps4* au cours de l'évolution témoigne de son rôle majeur dans le fonctionnement de la machinerie cellulaire [26]. Nous avons pu observer une variation du nombre de paralogues de *Vps4* selon les espèces. Les levures et *Archaea* portent un seul paralogue de *Vps4*. Les mammifères portent deux paralogues de *Vps4* fonctionnel. Chez les plantes, le nombre de paralogues varie d'une espèce à l'autre. Au sein de la famille des *Cucurbitaceae*, le melon, le concombre et la pastèque ont un seul paralogue de *Vps4*. D'autres comme la moutarde (*Momordica charantia*) ou la courgette (*Cucurbita pepo*) en portent deux. Au sein de la famille des *Solanaceae*, *Nicotiana attenuata* et *Nicotiana tabacum* ont un seul gène *Vps4*, alors que la tomate (*Solanum lycopersicum*) en possède 3.

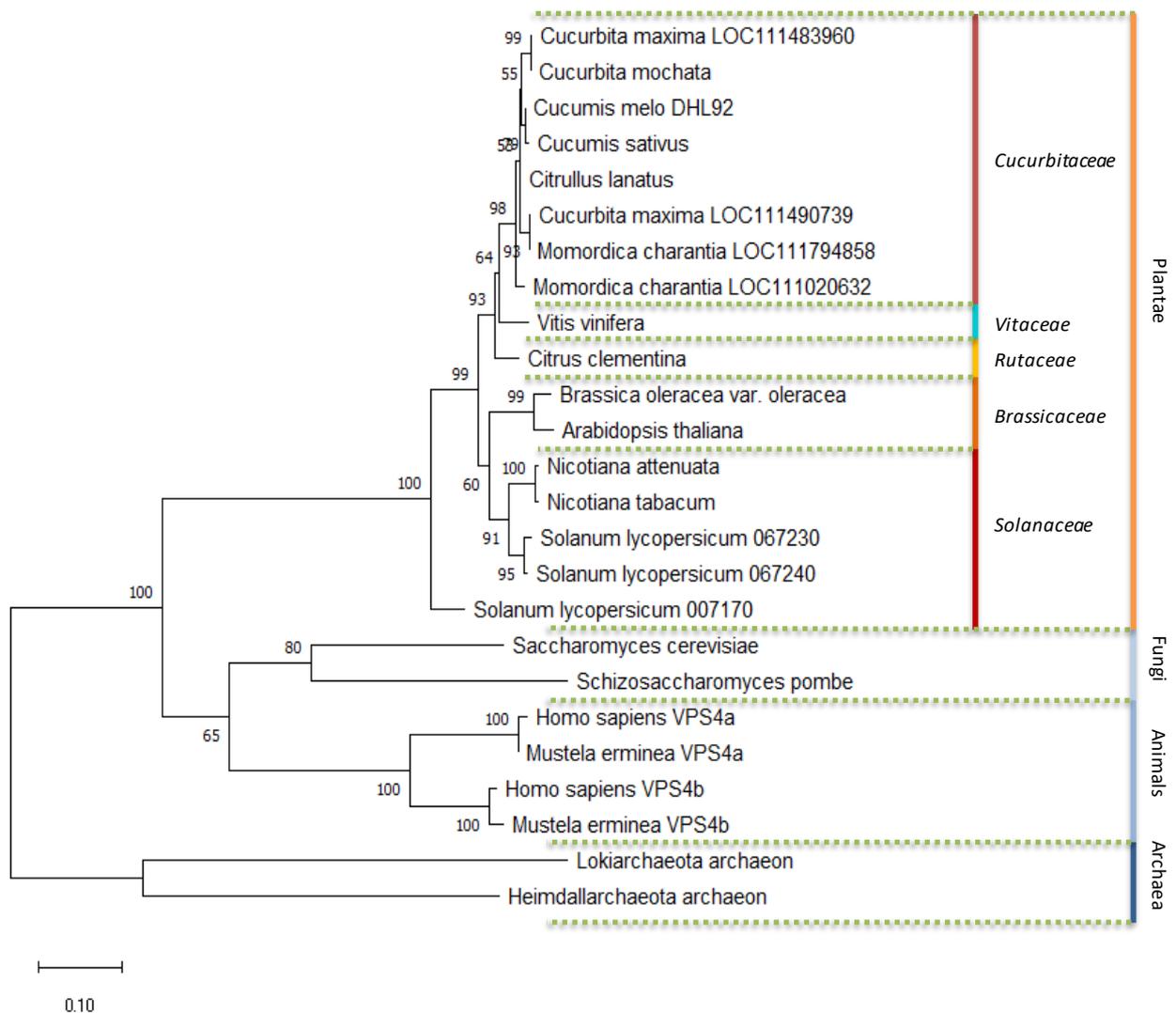


Figure 18 : Arbre phylogénétique de la séquence protéique VPS4 de différentes espèces.

L'arbre a été obtenu en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance. Les *Archaea* sont considérés comme le groupe externe. Les barres colorées correspondent à la classe et aux règnes auxquels appartiennent les espèces. La longueur des barres horizontales correspond à l'accumulation de substitutions dans chaque séquence protéique VPS4 entre deux branches. Les valeurs des nœuds représentent leur robustesse évaluée par Bootstrap à 1000 répétitions.

Nous retrouvons la structure en 3 domaines (MIT, AAA-ATPase, C-Ter) dans tous les règnes à l'exception des bactéries chez lesquelles aucun homologue du gène *Vps4* n'a été identifié. Le domaine AAA-ATPase qui a pour fonction d'hydrolyser les molécules d'ATP est le plus conservé parmi les protéines VPS4 des différents règnes d'espèces [27,28]. Le niveau de similarité/identité de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* avec *Homo sapiens* (VPS4a), *Saccharomyces cerevisiae* et *Lokiarchaeota archaeon* est de 90.4%/70.7%, 89.5/70.3% et 82,8%/50.6% respectivement (Table 1).

Le domaine MIT qui a pour fonction d'interagir avec d'autres partenaires protéiques a un niveau de conservation beaucoup plus faible entre les espèces des différents règnes (Table S4 à S6) [29,30]. Le domaine MIT de la protéine VPS4 de *Homo sapiens* (VPS4a), *Saccharomyces cerevisiae* et *Lokiarchaeota archaeon* ont respectivement une similarité/identité de 58,8%/26,3%, 40%/10% et 32,5%/5% comparé à *A. thaliana*. Cependant, parmi le règne des *Plantae*, nous observons un niveau d'identité sur l'ensemble de la protéine supérieur à 85% et de 88.8% pour le domaine MIT. Il a été observé des résultats similaires pour le domaine C-ter de VPS4 dont la fonction est de former un homo-multimère [31].

	Arabidopsis thaliana (Similarité / Identité)			
	VPS4	MIT:VPS4	AAA-ATPase:VPS4	C-ter:VPS4
Brassica oleracea var. oleracea	98,2% / 95,6%	100% / 98,8%	98,3% / 95,9%	98,6% / 95,7%
Cucurbita maxima LOC111490739	97,5% / 90,3%	97,5% / 93,8%	98,8% / 92,9%	94,3% / 78,6%
Cucurbita maxima LOC111483960	97,9% / 90,1%	97,5% / 95%	99,2% / 92,9%	94,3% / 77,1%
Momordica charantia LOC111794858	97,5% / 90,1%	97,5% / 93,8%	98,8% / 92,5%	94,3% / 78,6%
Momordica charantia LOC111020632	97,7% / 89,1%	97,5% / 93,8%	98,8% / 91,3%	95,7% / 77,1%
Citrullus lanatus	97,7% / 89,8%	97,5% / 93,8%	98,8% / 91,7%	95,7% / 80%
Cucumis melo DHL92	97,5% / 89,6%	97,5% / 95%	98,8% / 91,7%	94,3% / 77,1%
Cucurbita mochata	97,9% / 90,3%	97,5% / 95%	99,2% / 92,9%	94,3% / 77,1%
Cucumis sativus	97,2% / 89,6%	97,5% / 95%	98,3% / 91,7%	94,3% / 77,1%
Citrus clementina	97% / 89,2%	97,5% / 93,8%	98,3% / 92,1%	94,3% / 75,7%
Nicotiana attenuata	96,8% / 88,7%	95% / 90%	97,9% / 92,1%	98,6% / 81,4%
Nicotiana tabacum	96,5% / 88,7%	93,8% / 90%	97,9% / 92,1%	98,6% / 81,4%
Solanum lycopersicum 007170	94,3% / 85,3%	92,5% / 88,8%	97,1% / 90%	91,4% / 72,9%
Solanum lycopersicum 067230	96,3% / 89,3%	97,5% / 93,8%	97,5% / 91,7%	97,1% / 80%
Solanum lycopersicum 067240	96,5% / 89,6%	98,8% / 93,8%	97,5% / 92,1%	97,1% / 80%
Vitis vinifera	96,8% / 90,1%	98,8% / 93,8%	97,5% / 92,5%	94,3% / 78,6%
Lokiarchaeota archaeon	74,3% / 40,3%	40% / 10%	82,8% / 50,6%	58,5% / 26,8%
Heimdallarchaeota archaeon	77,4% / 40,7%	28,7% / 5%	79,2% / 47,1%	72,5% / 25%
Homo sapiens VPS4a	81,2% / 54,9%	58,8% / 26,3%	90,4% / 70,7%	69,7% / 34,8%
Homo sapiens VPS4b	81,8% / 55,4%	36,2% / 6,3%	90% / 71,3%	72,7% / 36,4%
Mustela erminea VPS4a	81,5% / 55,1%	58,8% / 26,3%	90,4% / 71,1%	69,7% / 34,8%
Mustela erminea VPS4b	82% / 55,8%	36,2% / 6,3%	90,4% / 71,7%	71,2% / 36,4%
Saccharomyces cerevisiae	82,5% / 55,1%	32,5% / 5%	89,5% / 70,3%	74,2% / 37,9%
Schizosaccharomyces pombe	82,1% / 52,4%	36,2% / 6,3%	90,8% / 66,2%	69,7% / 30,3%

Table 1 : Conservation des domaines de la protéine VPS4 comparé à *A. thaliana*.

Les niveaux de similarité et d'identité des protéines VPS4 de chaque espèce présentent dans la table a été obtenu suite à l'alignement multiple de la protéine VPS4 complète (VPS4), du domaine MIT (MIT:VPS4), du domaine AAA-ATPase (AAA-ATPase:VPS4) et du domaine C-ter (C-ter:VPS4).

Aucune diversité n'a été trouvée dans le domaine MIT chez Arabidopsis et la tomate

La conservation de la protéine VPS4 et notamment du domaine MIT chez les plantes nous permet de rechercher des allèles portant des substitutions proches de celles identifiées chez le concombre et conférant une résistance au ZYMV. De nombreuses données de reséquençage ont été publiées sur différentes espèces pouvant être utilisées pour identifier des substitutions d'intérêts. Pour cela, nous avons utilisé les bases de données disponibles des plantes *A. thaliana* et de tomate [32,33]. Les substitutions non-synonymes et non-sens ont été ciblées dans ces bases de données. L'analyse de la diversité intra-espèce chez *A. thaliana* a permis d'identifier 3 allèles de VPS4 sur une collection de 1184 accessions. On retrouve les substitutions AtVPS4^{Y2F}, AtVPS4^{G366A} et AtVPS4^{L391F} chacune portée par une seule accession. La substitution AtVPS4^{Y2F} est positionnée au début du domaine MIT en amont de la première hélice-alpha dans une région non structurée de la protéine. La substitution AtVPS4^{G366A} est positionnée à l'inter-domaine AAA-ATPase et C-ter dans une région non structurée. La substitution AtVPS4^{L391F} est positionnée dans le domaine C-ter. Ces trois substitutions induisent des modifications conservatives, qui sont prédites comme influant peu sur la structure et les interactions de la protéine. Il n'a été identifié aucune substitution non conservative dans le domaine MIT ou dans le reste de la protéine VPS4.

De la même manière, nous avons recherché la diversité chez les trois paralogues de *Vps4* de la tomate. Deux des paralogues ont une séquence protéique très proche (067230 et 067240). Le troisième (007170) accumule de nombreuses substitutions en comparaison des deux autres. Cependant, la recherche de substitutions sur le domaine MIT dans 510 accessions n'a montré aucune substitution non-synonyme et non-sens sur chacun des paralogues.

Le séquençage du domaine MIT de VPS4 chez le melon révèle de la diversité

Nous avons utilisé le réseau de ressources génétiques du CRBLeg du GAFL d'Avignon pour séquencer le gène *Vps4* chez 652 accessions de melon. Ces accessions sont originaires de toutes les régions du monde et sont représentatives de la diversité cultivée et sauvage du melon [34].

L'allèle du gène *Vps4* porté par l'accèsion Charentais Monoïque (CM) est utilisé comme référence. Les résultats du séquençage de la collection nous ont permis d'identifier 4 allèles dont la séquence protéique codée par le gène *Vps4* est modifiée (Table 2). La majorité des accessions porte le même allèle que CM. L'allèle *CmVps4*^{P30S} porté par l'accèsion DHL92 dont le génome a été entièrement séquencé est retrouvé uniquement chez l'accèsion PI 161375 dont elle est issue [35]. Cette accèsion est originaire de Corée. L'allèle *CmVps4*^{P30R} est retrouvé dans les accessions TGR-1551, IVT 2365, PI 482398 et PI 482399. Ces 4 accessions sont originaires du continent Africain. Les accessions TGR-1551, PI 482398 et PI 482399 proviennent du Zimbabwe. Cependant l'origine de IVT 2365 est incertaine. L'allèle *CmVps4*^{K40R} a été trouvé chez les accessions Humaid 93-4, Humaid 93-10, HSD 2441, HSD 2445, HSD 2446, HSD 2447 et HSD 2458. Ces accessions sont toutes originaires du Soudan. Les mutations non-synonymes des trois allèles *CmVps4*^{P30S}, *CmVps4*^{P30R} et *CmVps4*^{K40R} sont identifiées sur le domaine MIT de VPS4. Le dernier allèle *CmVps4*^{P223S} est retrouvé chez l'accèsion PI 436533 originaire du Sénégal. La substitution non-synonyme sur cet allèle est localisée sur le domaine AAA-ATPase de la protéine VPS4. Le nombre des accessions portant un allèle variant de *Vps4* est plus important que ce qu'il a été constaté au sein des collections d'*A. thaliana* et de la tomate. Il reste cependant faible avec 2.3% des accessions séquencées portant une substitution non-synonyme sur le gène *Vps4*.

Base Change	AA Change	Domaine	Accession
C88G	P30S	MIT	PI 161375
C89G	P30R	MIT	TGR-1551, IVT 2365, PI 482398, PI 482399
A119G	K40R	MIT	HSD 2441, HSD 2445, HSD 2446, HSD 2447, HSD 2458, Humaid 93-4, Humaid 93-10
C667T	P223S	AAA-ATPase	PI 436533

Table 2 : Liste des allèles du gène *Vps4* issue de la collection du melon.

Les données représentées dans la table proviennent du séquençage de 652 accessions de melon. La protéine VPS4 issue de Charentais Monoïque (CM) est utilisée comme référence. Seules les substitutions non-synonymes sont considérées.

Les substitutions sur *CmVps4*^{P30R}, *CmVps4*^{P30S} et *CmVps4*^{K40R} modifient l'encombrement stérique du domaine MIT.

Afin de localiser les substitutions identifiées sur la protéine VPS4 dans la diversité naturelle du melon et d'estimer leur impact potentiel sur la structure de la protéine, nous avons utilisé les données de cristallographie disponibles. Seule la modélisation basée sur la cristallographie de VPS4b d'*Homo sapiens* est disponible à ce jour [31]. D'après ces données de cristallographie, la structure du domaine MIT est organisée en 3 hélice-alpha antiparallèles. Les mutations F29S et M33I présentes sur la protéine VPS4 chez plusieurs accessions de concombres sont impliquées dans la résistance au ZYMV [11]. Ces deux substitutions sont situées sur la seconde hélice-alpha du domaine MIT et sont prédites comme partiellement exposées (Figure 19). La modification de l'exposition d'un acide aminé au milieu environnant peut modifier la capacité d'une protéine à interagir avec d'autres protéines ou molécules. Nous nous intéressons ainsi aux modifications induites chez le melon par les substitutions *CmVps4*^{P30R}, *CmVps4*^{P30S} et *CmVps4*^{K40R} sur la structure secondaire de la protéine VPS4.

Chez le melon, les substitutions P30S et P30R identifiées sur la protéine VPS4 sont également situées sur la seconde hélice-alpha du domaine MIT et sont prédites comme exposées. Chez l'accession CM, l'acide aminé situé à la position 30 de la protéine VPS4 est une proline. La proline est un acide aminé de petite taille, apolaire, hydrophile et non chargé. De plus, du fait de la conformation particulière de la molécule et de son cycle aromatique, il impose un changement d'orientation dans les structures secondaires des protéines [36]. Dans le cas de l'allèle *CmVps4*^{P30S} avec le remplacement d'une proline par une sérine à la position 30, la structure perd le changement d'orientation imposé par la proline ainsi que son cycle aromatique. De plus, la sérine est un acide aminé polarisé contrairement à la proline. Dans le cas de l'allèle *CmVps4*^{P30R} avec le remplacement d'une proline par une arginine à la position 30, la structure perd également le changement d'orientation imposé par la proline et son cycle aromatique. L'arginine est un acide aminé de grande taille, polarisé et chargé positivement [37].

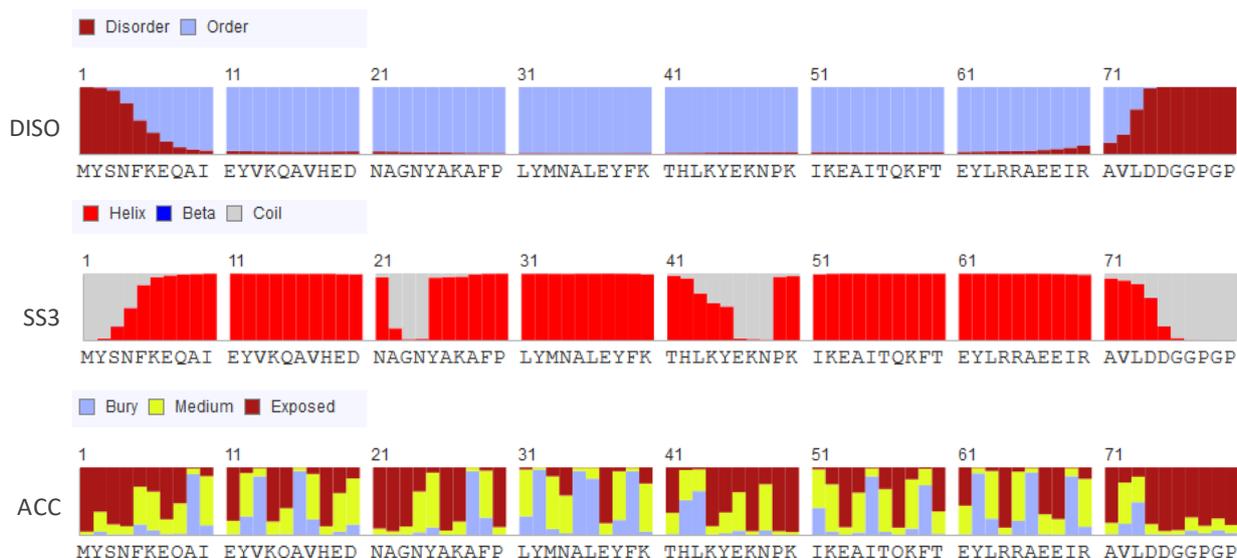


Figure 19 : Exposition structurale des acides aminés du domaine MIT de CmVPS4.

Les régions désordonnées (DISO) représentent la prédiction d'ordre / désordre basée sur la valeur « cutoff » à 0,25, respectivement. Pour la structure secondaire à 3 états (SS3), le rouge, le bleu et le gris représentent respectivement l'hélice alpha, la feuille bêta et les coudes. L'accessibilité aux solvants (ACC) concernés est divisée en trois états par 2 valeurs « cutoff » : 10% et 40% afin que les trois états aient une distribution égale. Enterré pour moins de 10%, exposé pour plus de 40% et moyen pour entre 10% et 40% [38–41].

L'acide aminé situé à la position 40 de la protéine VPS4 chez le melon est une lysine et est prédit partiellement exposé. Cet acide est de grande taille, chargé positivement et hydrophobe. Le remplacement d'une lysine par une arginine à la position 40 de la protéine VPS4 est une modification considérée comme conservative. Cependant l'arginine est un acide aminé hydrophile contrairement à la lysine.

La modélisation de la structure du domaine MIT de VPS4 pour les allèles *CmVps4*^{P30R}, *CmVps4*^{P30S} et *CmVps4*^{K40R} ne permet pas de prédire un changement dans la structure de l'hélice (figure 20). Le manque de données sur la structure du domaine MIT ne permet pas d'identifier des modifications majeures dans la structure secondaire du domaine MIT chez le melon. Cependant, les substitutions présentes sur les allèles *CmVps4*^{P30R}, *CmVps4*^{P30S} et *CmVps4*^{K40R} induisent des changements de propriétés et peuvent influencer sur les interactions protéiques.

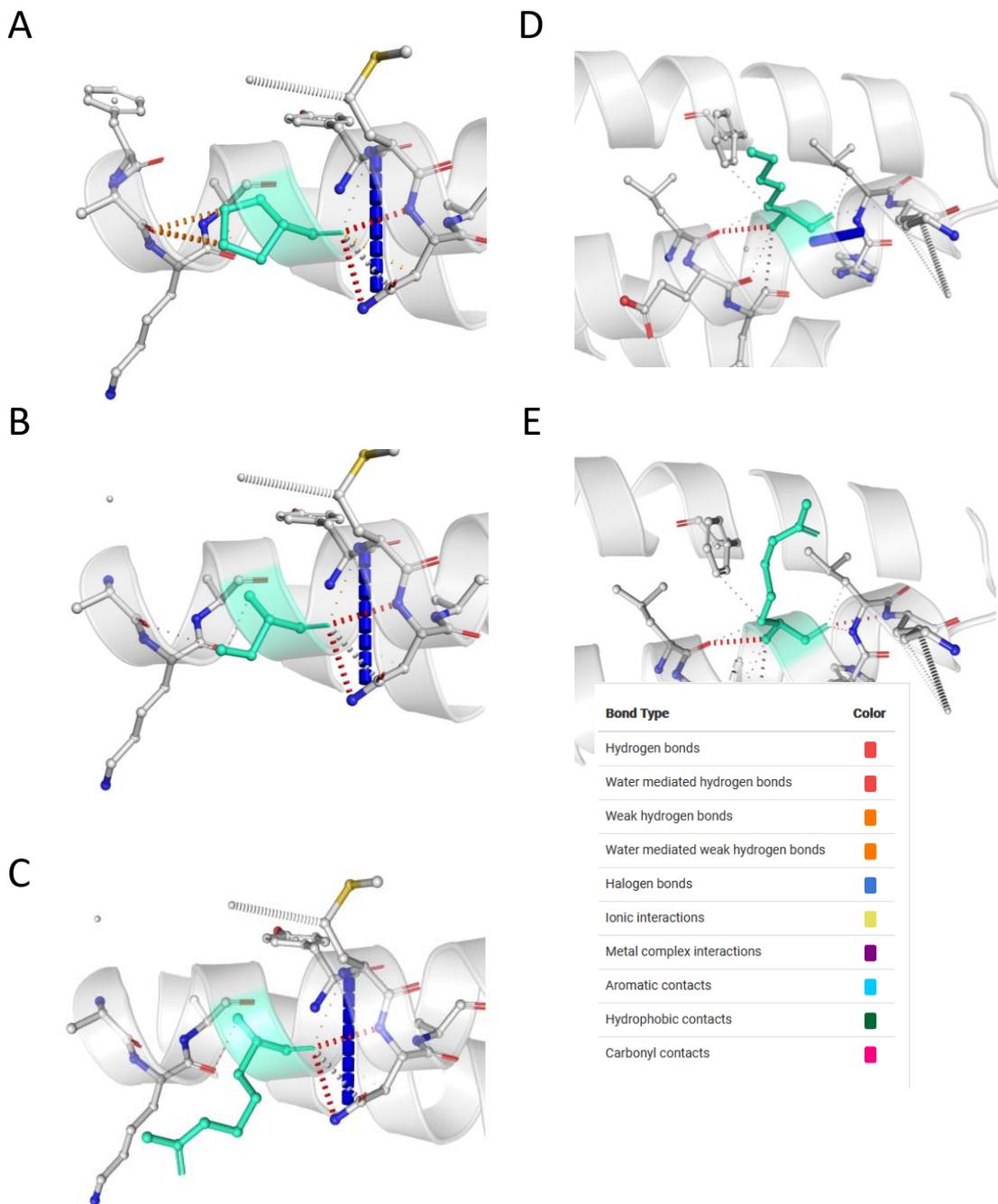


Figure 20 : Modélisation de la structure du domaine MIT du melon.

Modélisation de la structure et des interactions entre les acides aminés du domaine MIT pour les protéines CmVPS4^{wt}, CmVPS4^{P30S}, CmVPS4^{P30R} et CmVPS4^{K40R}. (A) Structure de la seconde hélice alpha centrée sur la position 30 de la protéine CmVPS4^{wt} (B) Centrée sur la position 30 de la protéine CmVPS4^{P30S}. (C) Centrée sur la position 30 de la protéine CmVPS4^{P30R}. (D) Centrée sur la position 40 de la protéine CmVPS4^{wt}. (E) Centrée sur la position 40 de la protéine CmVPS4^{K40R}. Les barres vertes représentent les acides aminés sauvages et modifiés. Les barres grises représentent les acides aminés en contact avec l'acide aminé représenté en vert. Les résidus bleus et rouges représentent les groupements amine et acide carboxyle des acides aminés. Les liaisons sont représentées par les barres en pointillé.

Les allèles *CmVps4*^{P30R}, *CmVps4*^{P30R} et *CmVps4*^{K40R} chez le melon n'induisent pas de résistance au ZYMV

Afin d'évaluer l'impact des changements des acides aminés dans la protéine VPS4 sur la sensibilité aux virus, les accessions portant les allèles *CmVps4*^{P30R}, *CmVps4*^{P30R} et *CmVps4*^{K40R} ont été infectés par le ZYMV et comparées au contrôle sensible Charentais Monoïque (CM) (Figure 21). Les symptômes ont été notés sur une échelle de notation de 0 à 3, à 14 jours après inoculation. PI 414723 est une accession résistante au ZYMV. Cette résistance est conférée par un gène dominant (*Zym*) non lié à *Vps4* [42]. PI 414723 porte le même allèle *Vps4* que CM (*CmVps4*^{wt}).

Suite à l'infection au ZYMV des accessions portant l'allèle *CmVps4*^{P30R}, aucune différence significative avec CM n'a été observée. L'accession IVT 2365 qui a une note de 3 correspond à une sénescence de l'ensemble des plantes infectées. Celle-ci est due soit à une très forte expression des symptômes, soit à une réaction immunitaire hypersensible induisant la mort de l'ensemble des tissus infectés. Cette réponse n'est pas observée chez TGR-1551 et PI 482399 qui présentent de forts symptômes. Par manque de réplicats, l'accession PI 482398 n'est pas représentée ici. Les résultats préliminaires ne montrent aucune réduction de symptômes comparés à CM (données non présentées). De la même manière, PI 161375, seule accession identifiée portant l'allèle *CmVps4*^{P30S}, ne montre aucune réduction de symptômes suite à l'infection au ZYMV.

Les accessions HSD 2441, HSD 2445 et Humaid 93-10 portant l'allèle *CmVps4*^{K40R} ne montrent aucune diminution de symptômes suite à l'infection par le ZYMV. Seule l'accession Humaid 93-4 présente une absence totale de symptômes, qui ne peut pas être associée à l'allèle *CmVps4*^{K40R}. Les accessions HSD 2446, HSD 2447, HSD 2458 n'ont pu être testées en raison d'un très faible taux de germination et un développement fortement impacté par les conditions de température non optimales. Contrairement à l'allèle de *Vps4* résistant chez le concombre, les allèles *CmVps4*^{P30S}, *CmVps4*^{P30R} et *CmVps4*^{K40R} n'induisent pas de résistance au ZYMV chez le melon, dans les conditions et avec la souche testée.

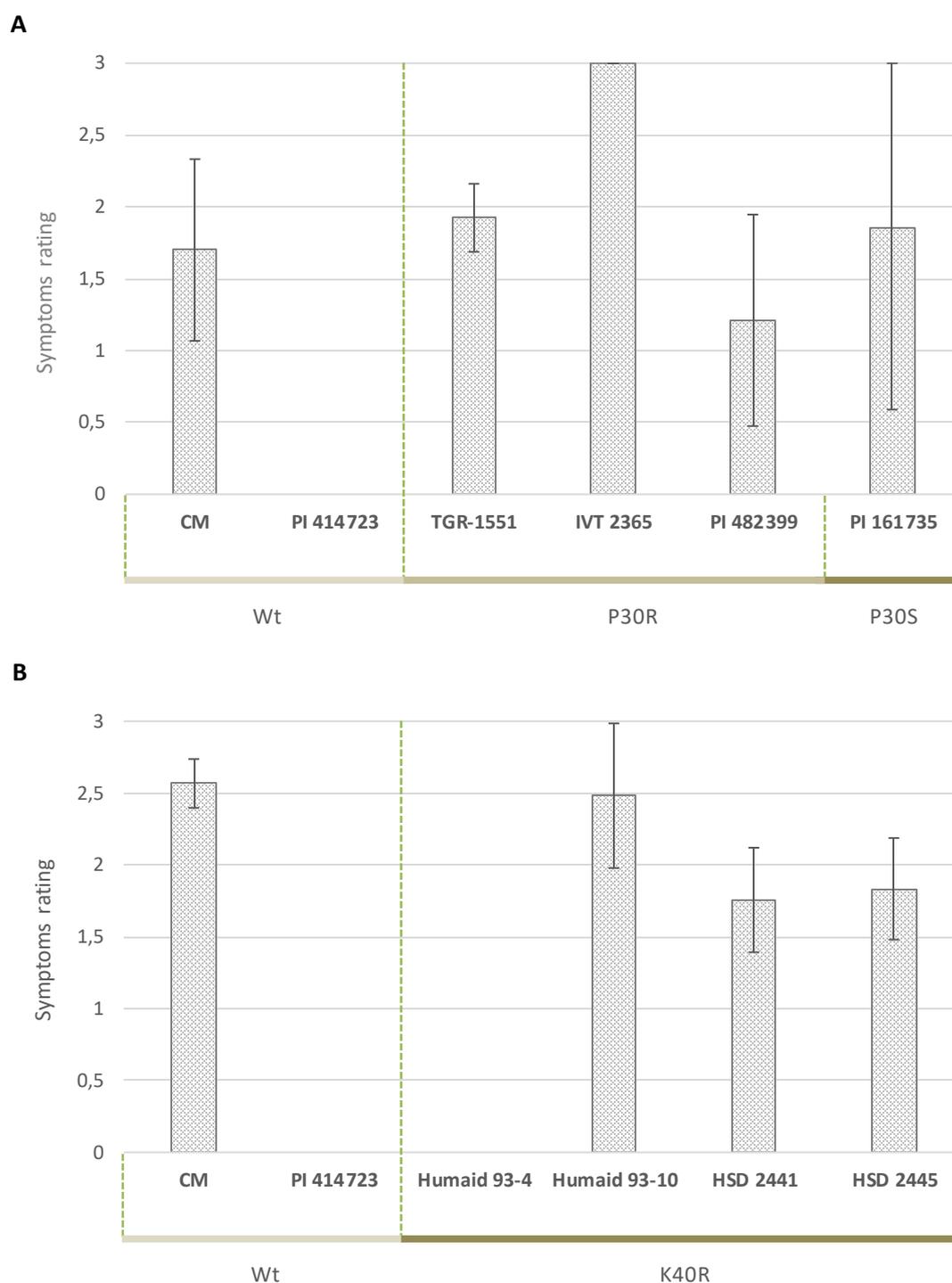


Figure 21 : Symptômes présentés après infection par le ZYMV chez des accessions de melon portant différents allèles de *CmVPS4*.

L'accession sensible Charentais Monoïque (CM) et l'accession résistante PI 414723 sont utilisées comme témoins du test de résistance au ZYMV. (A) Notation des symptômes de ZYMV sur les accessions portant l'allèle *Vps4*^{P30R} (P30R) et *Vps4*^{P30S} (P30S ; n ≥ 8) à 20 jours après inoculation (dpi). La notation moyenne sur une échelle de 0 à 3 est représentée. (B) Accumulation du WMV sur les accessions portant l'allèle *Vps4*^{K40R} (K40R ; n ≥ 9) par rapport à CM à 20 dpi.

Les accessions portant l'allèle *Vps4*^{P30R} et *Vps4*^{K40R} sont résistantes au WMV

L'accession de melon TGR-1551 est déjà caractérisée pour plusieurs résistances dont celle au WMV. La résistance au WMV chez TGR-1551 est principalement contrôlée par un gène récessif. Une cartographie génétique a permis d'identifier une région génétique impliquée dans la résistance au WMV sur le chromosome 11 du melon. Cette région génétique comprend plus d'une centaine de gènes candidats [21]. Nous avons identifié le gène MELO3C021413 qui code pour la protéine VPS4 dans cet intervalle. Afin de tester l'impact des allèles de *Vps4* sur la sensibilité au WMV, nous avons infecté les accessions présentant les différents allèles de *Vps4* vis-à-vis de la souche WMV-fr et noté les symptômes sur une échelle de 0 à 3 (Figure WMV_P30R_A). 20 jours après l'inoculation au WMV, l'accession TGR-1551 portant l'allèle *Vps4*^{P30R} présente comme attendu une réduction significative de symptômes comparé à CM (Figure 22A). Ce phénotype se caractérise par une absence totale de symptômes, à l'exception de rares taches chlorotiques. Cela témoigne du maintien du virus dans la plante. Les autres accessions identifiées portant ce même allèle : IVT 2365, PI 482399 et PI 482398, présentent également une diminution significative des symptômes par rapport à l'accession CM et le maintien de rares taches chlorotiques comme observé chez TGR-1551. Afin de confirmer les observations, nous avons évalué la capacité du virus à se répliquer dans ces accessions. Pour cela nous avons comparé la charge virale dans chacune d'entre-elles avec celle de l'accession CM (Figure 22B). Il a été observé une diminution significative de la quantité de particules virales estimée dans les quatre accessions portant l'allèle *Vps4*^{P30R}. Ces résultats montrent que l'ensemble des accessions portant l'allèle *Vps4*^{P30R} présentent une résistance au WMV. La mutation identifiée sur le gène *Vps4* présent dans la région génétique impliquée dans la résistance au WMV chez TGR-1551 est ainsi un candidat majeur pour apporter cette résistance. De la même manière, nous avons comparé les symptômes sur l'accession PI 161375 qui porte l'allèle *Vps4*^{P30S}. Aucune réduction de symptôme n'a été observée pour cette accession.

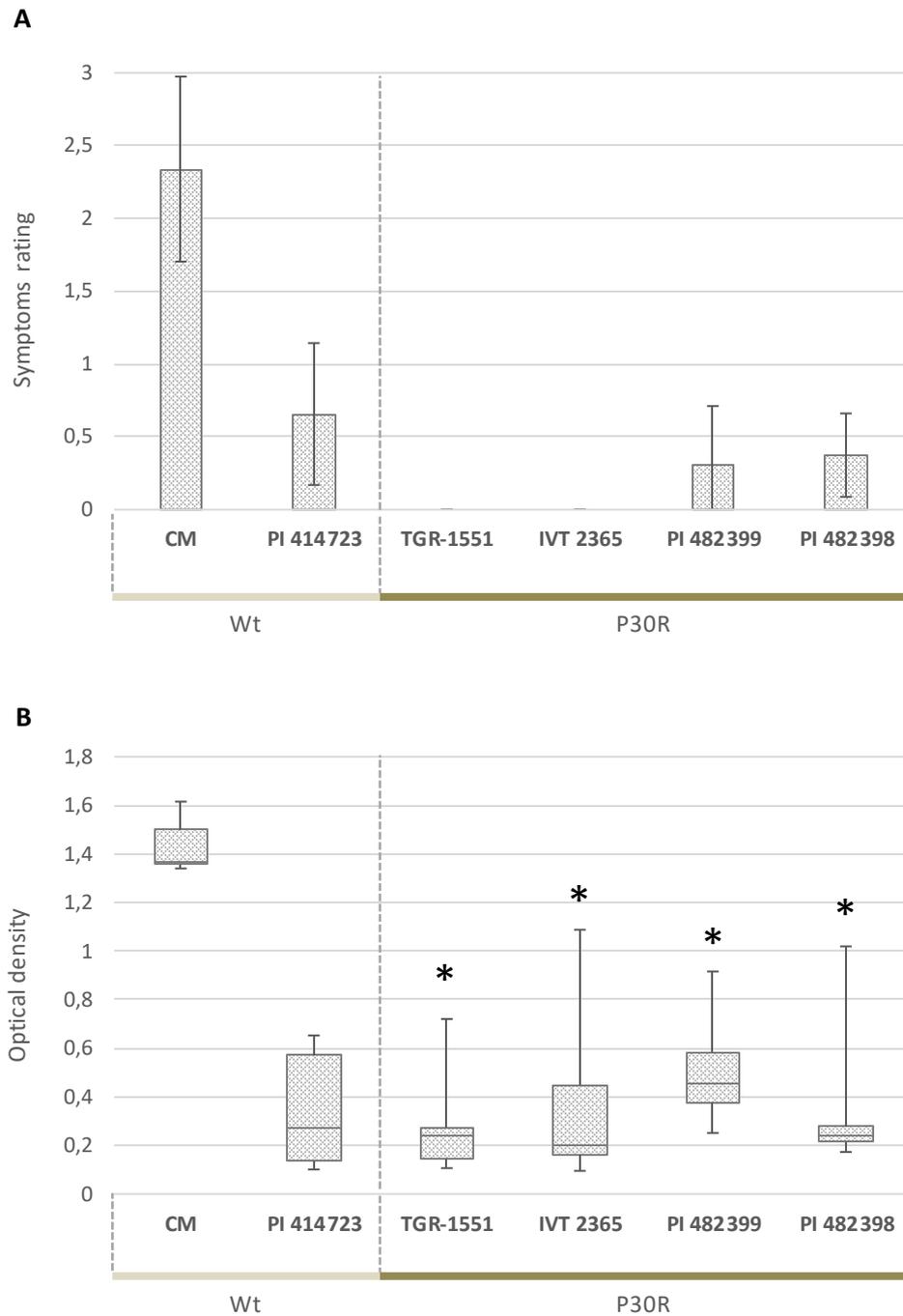


Figure 22 : Tests de résistance au WMV pour les melons portant l'allèle *CmVps4*^{P3OR}.

L'accession sensible CM et l'accession résistante PI 414723 sont utilisées comme témoins du test de résistance au WMV. (A) Notation des symptômes de WMV sur les accessions portant l'allèle *Vps4*^{P3OR} (P3OR ; n ≥ 8) à 20 jours après inoculation (dpi). La notation moyenne sur une échelle de 0 à 3 est représentée. (B) Accumulation du WMV sur les accessions portant l'allèle *Vps4*^{P3OR} (P3OR ; n ≥ 8) par rapport à CM à 20 dpi. L'astérisque représente une différence significative avec le contrôle sensible CM pour α = 0.05.

Les accessions HSD 2441, HSD 2445, Humaid 93-4 et Humaid 93-10 portant l'allèle *Vps4*^{K40R} montrent quant à elles une diminution significative des symptômes après inoculation au WMV comparé à CM (Figure 23). Suite à un manque de réplicats pour l'accession PI 414723 résistant au WMV, l'accession Pastis 1 a été utilisée comme contrôle résistant. Les accessions HSD 2441, HSD 2445, Humaid 93-4 et Humaid 93-10 ont également montré une diminution significative de la charge virale suite à l'inoculation avec le WMV. Les accessions HSD 2446, HSD 2447 et HSD 2458 n'ont pu être testées en raison de leur très faible taux de germination et un développement fortement impacté par les conditions de température et de luminosité non optimales.

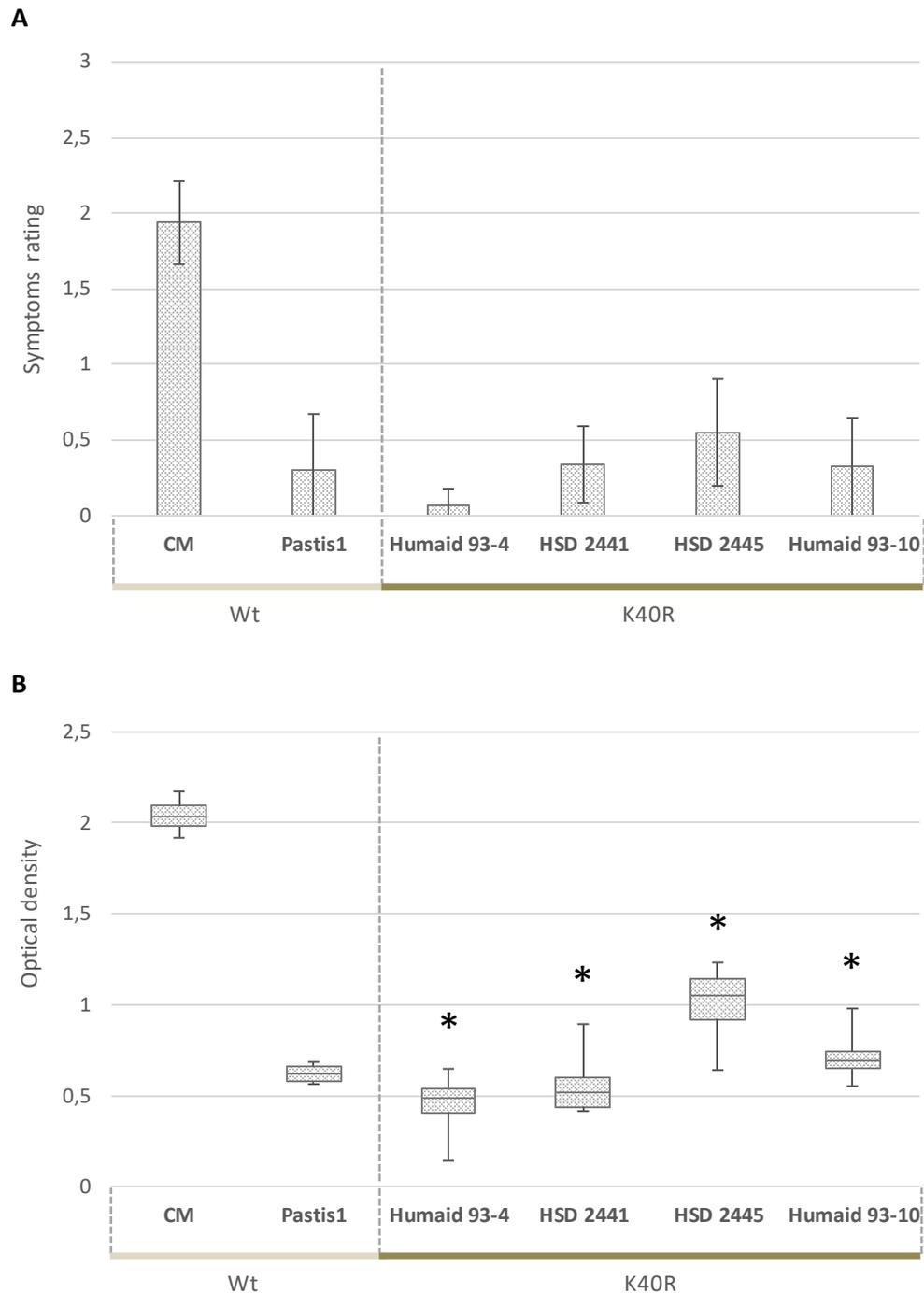


Figure 23 : Test de résistance au WMV pour les accessions de melons portant l'allèle *CmVps4*^{K40R}.

L'accession sensible Charentais Monoïque (CM) et l'accession résistante PI 414723 sont utilisées comme témoins du test de résistance au WMV. (A) Notation des symptômes de WMV sur les accessions portant l'allèle *Vps4*^{K40R} (P30R ; n ≥ 8) à 20 jour après inoculation (dpi). La notation moyenne sur une échelle de 0 à 3 est représentée. (B) Accumulation du WMV sur les accessions portant l'allèle *Vps4*^{K40R} (P30R ; n ≥ 8) par rapport à CM à 20 dpi. L'astérisque représente une différence significative avec le contrôle sensible CM pour $\alpha = 0.05$.

Le crible d'une collection EMS de melon pour le gène Vps4 ne présente pas de diversité sur le domaine MIT

Afin de démontrer le rôle de *Vps4* dans la résistance aux virus, nous avons utilisé une approche de TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) sur une collection mutagénisée par EMS du melon Charentais Monoïque (CM) pour identifier de la diversité induite dans le gène *CmVps4*. Dans un second temps, nous avons phénotypé les familles portant un allèle muté de *CmVps4* qui induit un changement dans la protéine codée pour leur résistance au WMV et ZYMV.

La mutagénèse par EMS génère aléatoirement des mutations sur l'ensemble du génome. Les mutations ainsi obtenues sont hétérozygotes. Nous avons séquencé le gène *CmVps4* de l'ensemble de la collection pour identifier des mutations non-synonymes ou des mutations non-sens (figure 24). Il a été identifié sur cette collection 13 familles portant une mutation non-synonyme sur le gène *CmVps4*. Les plantes M2 de chacune de ces familles ont été génotypées et les homozygotes autofécondés, afin de fixer les mutations. 3 de ces substitutions sont localisées sur l'inter-domaine MIT/AAA-ATPase, 7 sur le domaine AAA-ATPase et 3 sur le domaine C-terminal. Aucune mutation sur le domaine MIT n'a été identifiée. De plus, il n'a été trouvé aucune mutation non-sens sur l'ensemble de la collection dans le gène ciblé.

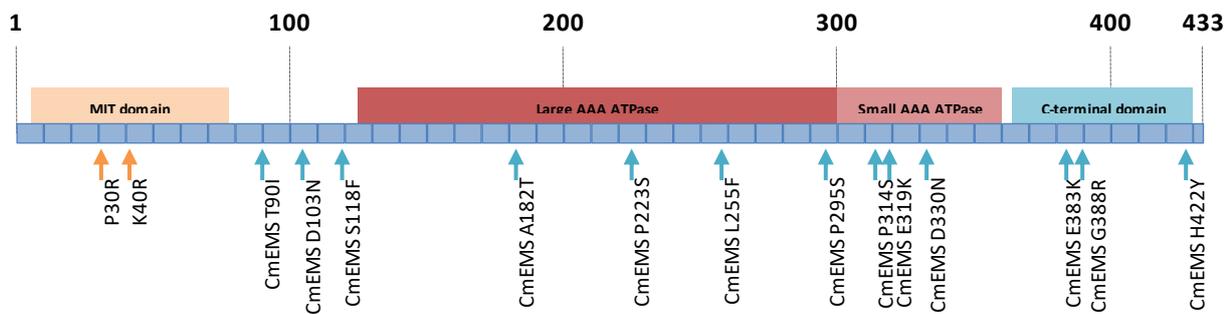


Figure 24 : Représentation de la disposition des substitutions naturelles et des mutations induites sur la protéine VPS4 du melon.

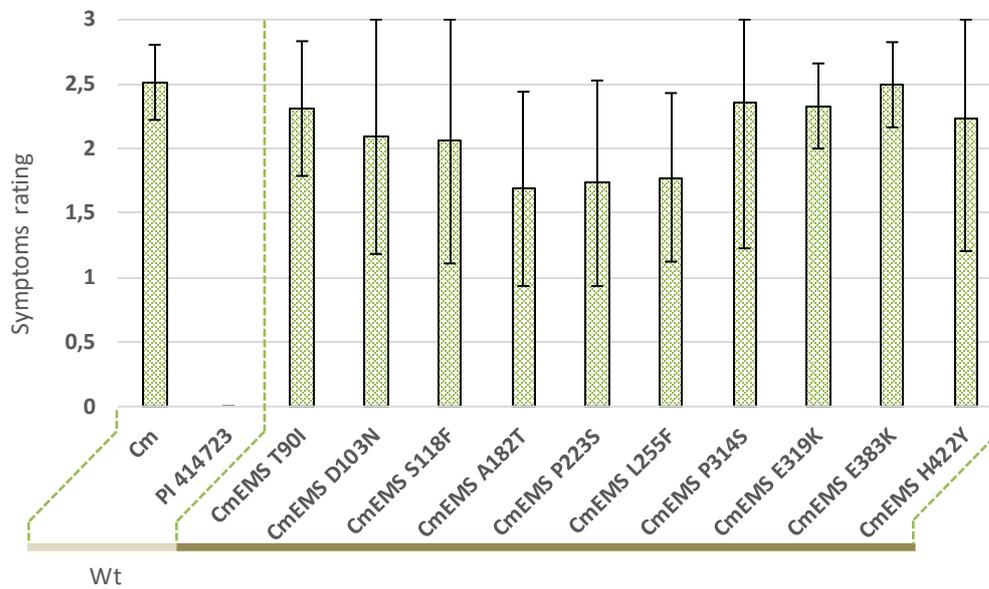
L'échelle de 1 à 433 représente les positions des acides aminés sur la protéine VPS4. Les flèches vertes indiquent les substitutions issues de la diversité naturelle. Les flèches bleues représentent les mutations issues de la diversité induite.

Les familles EMS portant une substitution non-synonyme sur le gène *CmVps4* ne sont pas résistantes au ZYMV et au WMV

Afin d'identifier une résistance chez l'une des familles portant une substitution sur la protéine VPS4, nous avons phénotypé 10 des 13 familles EMS de melon vis-à-vis du ZYMV (Figure 25A). Les résultats nous ont montré qu'aucune de ces familles ne présente une diminution de symptômes en comparaison de CM suite à l'infection au ZYMV.

De la même manière, nous avons phénotypé les familles M3, homozygotes pour une mutation non-synonyme dans le gène *Vps4*, vis-à-vis du WMV (Figure 25B). La famille CmEMS P223S a montré une diminution significative des symptômes, comparé à CM, après infection avec le WMV. Les autres familles EMS ne présentent quant à elles aucune différence significative avec CM. Chaque famille issue de la collection EMS porte une estimation de 1000 substitutions sur leur génome. Pour vérifier le rôle de la mutation *CmVps4*^{P223S} de la famille CmEMS P223S dans la diminution des symptômes observée après infection par le WMV, nous avons évalué la résistance d'une population M3 obtenue après autofécondation d'une plante M2 hétérozygote pour la mutation (équivalent d'une population naturelle en génération F2). Pour cela, nous avons génotypé et inoculé la population en ségrégation pour la mutation avec le WMV et comparé la charge virale dans les 3 groupes de génotype pour *CmVps4* : homozygote wt, [wt/wt], homozygote mutant [mut/mut] et hétérozygote [wt/mut] (figure 26). L'accumulation de la charge virale dans chacun des 3 groupes ne présente aucune différence significative entre eux. Cependant, la population M3 de la famille CmEMS P223S présente une différence significative de charge virale, comparé au sensible CM. Cela révèle la présence d'une résistance au WMV dans cette population qui n'est pas liée à la mutation P223S.

A



B

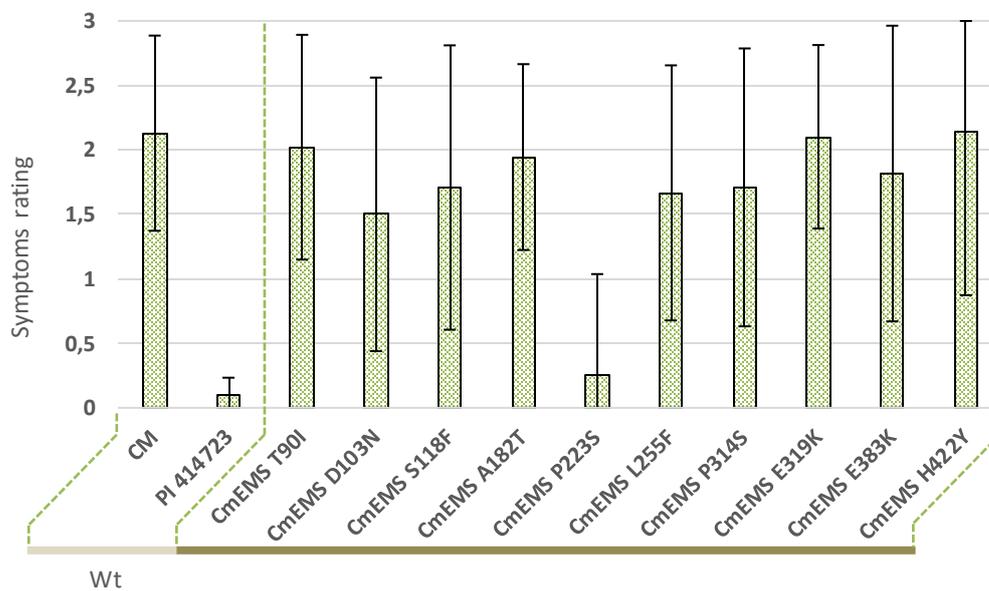


Figure 25 : Symptômes présentés par différentes familles de melon mutagénisées à l'EMS, homozygotes pour les mutations dans le gène *CmVps4*

La notation moyenne sur une échelle de 0 à 3 est représentée. Les accessions Charentais Monoïques (CM) et PI 414723 sont utilisées comme témoins. (A) Notation des symptômes du ZYMV sur les familles CmEMS ($n \geq 5$). (B) Notation des symptômes WMV ($n \geq 5$) sur les familles CmEMS à 20 dpi.

Les vecteurs viraux WMV-LLA10-*CmVps4*^{wt} et le WMV-LLA10-*CmVps4*^{P30R} sont infectieux

Pour contourner l'absence de diversité induite sur le domaine MIT, nous avons mis en place une stratégie alternative permettant de tester le rôle de l'allèle *CmVps4*^{P30R} dans la résistance au WMV. L'approche de complémentation de la résistance dans les conditions actuelles de transformation génétique du melon n'est pas réalisable. Cependant, la transformation génétique du WMV nous permet d'utiliser le virus comme vecteur. La résistance au WMV chez l'accession TGR-1551 est contrôlée de manière récessive. Ainsi en inoculant TGR-1551 avec le WMV transformé avec l'allèle *CmVps4*^{wt} issu de l'accession CM, nous pouvons observer si le virus restaure la sensibilité au WMV. La souche WMV-LLA1 a été intégrée dans un plasmide pour insérer le gène codant pour la protéine GFP ; la construction sera nommée WMV-LLA1-GFP. De la même manière, nous avons transformé les allèles *CmVps4*^{wt} issus de CM et *CmVps4*^{P30R} issus de TGR-1551 dans le WMV et obtenu les constructions qui seront nommées respectivement WMV-LLA1-*CmVps4*^{wt} et WMV-LLA1-*CmVps4*^{P30R} par la suite.

Les symptômes et l'accumulation de la charge virale dans TGR-1551 et CM ont été évalués après infection avec la construction WMV-LLA1-GFP (figure 27A et figure S1). Nous avons pu observer des résultats semblables à ceux observés avec la souche WMV-Fr. L'accession CM présente des symptômes et une charge virale forte contrairement à TGR-1551 dont les symptômes sont peu présents et la charge virale est significativement plus faible que pour CM.

Les symptômes et l'accumulation de la charge virale dans CM ont été évalués après infection avec les constructions WMV-LLA1-*CmVps4*^{wt} et WMV-LLA1-*CmVps4*^{P30R} (figure 27B et figure S1). Nous avons pu observer la présence de symptômes et une charge virale élevée chez CM pour les deux souches de virus. Cela nous confirme que les deux virus transformés avec les gènes codants pour les protéines *CmVPS4*^{wt} et *CmVPS4*^{P30R} sont capables de se répliquer et d'infecter le melon. Nous n'observons aucune différence significative dans l'infectiosité des deux souches. Cependant un effet faible semble réduire la charge virale dans le cas de l'infection de CM avec la souche WMV-LLA1-*CmVps4*^{P30R}.

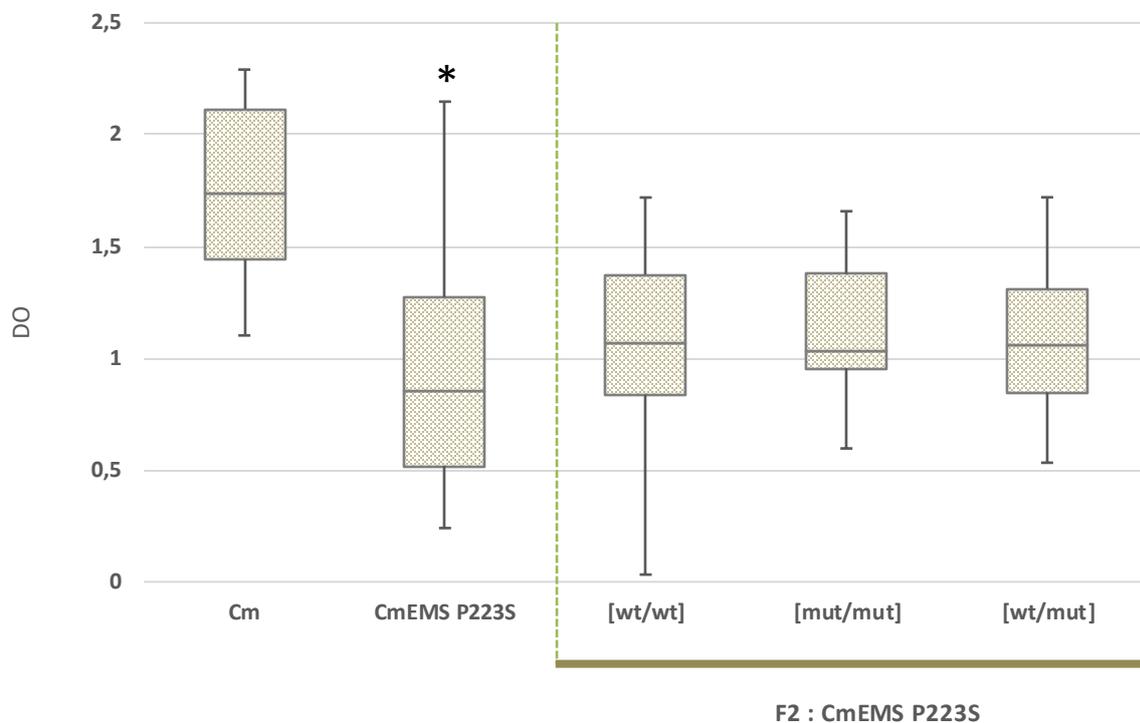


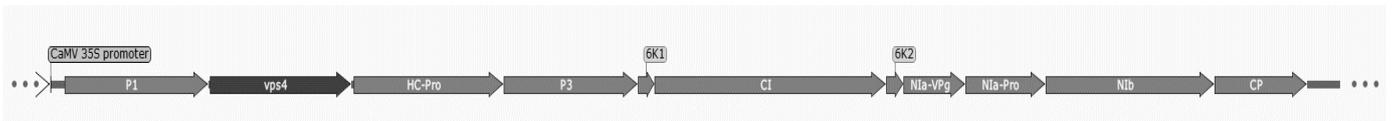
Figure 26 : Accumulation virale dans la famille CmEMS P223S en ségrégation pour l'allèle *CmVps4 P223S* après inoculation au WMV.

Les résultats de densité optique (DO) issus du prélèvement des feuilles les plus jeunes sont présentés. Les échantillons ont été collectés après 20 dpi. L'accession Charentais Monoïque (CM) porte l'allèle *CmVps4^{wt}*. La famille CmEMS P223S porte l'allèle *CmVps4^{P223S}*. La famille F2 : CmEMS P223S est répartie en trois groupes en fonction du génotype associé au gène *Vps4* : *CmVps4^{wt}* [wt/wt], *CmVps4^{P223S}* [mut/mut] et *CmVps4^{wt}/CmVps4^{P223S}* [wt/mut]. L'astérisque représente une différence significative avec le contrôle sensible CM pour $\alpha = 0.05$.

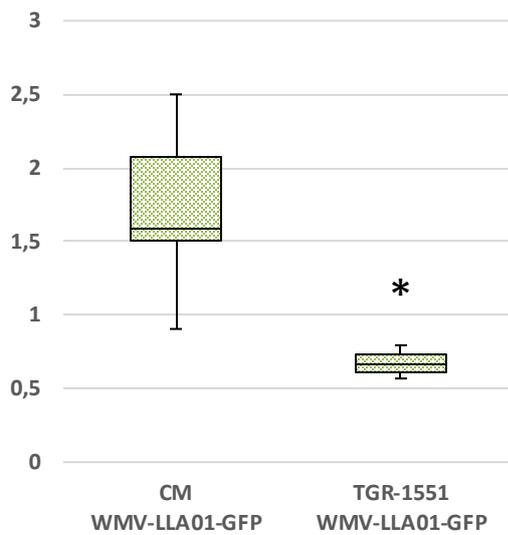
TGR-1551 présente une forte charge virale après inoculation avec la souche WMV-LLA10-CmVps4^{P30R}

Les symptômes et l'accumulation de la charge virale dans TGR-1551 ont été évalués après infection avec les constructions WMV-LLA1-CmVps4^{Wt} et WMV-LLA1-CmVps4^{P30R} (figure 28 et figure S1). Nous avons pu observer la présence de symptômes et une charge virale élevée chez l'accession TGR-1551 infectée avec la souche WMV-LLA1-CmVps4^{Wt} contrairement aux plantes TGR-1551 infectées avec la souche WMV-LLA1-CmVps4^{P30R}. Cela permet d'affirmer que l'absence de la mutation P30R sur la protéine VPS4 est suffisante pour permettre au virus d'infecter l'accession TGR-1551.

A



B



C

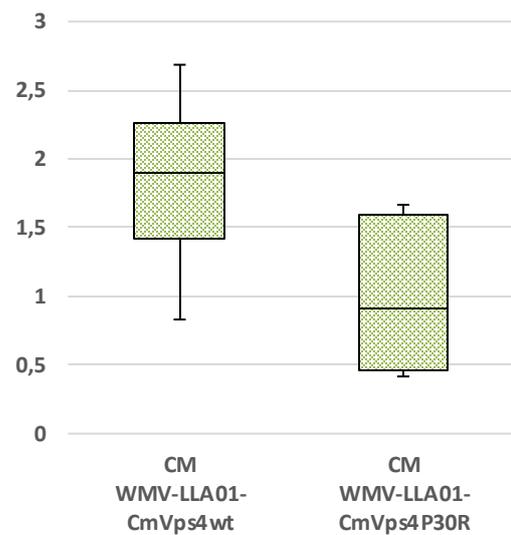


Figure 27 : Accumulation virale des souches de WMV transformées avec le gène *CmVps4* dans Charentais Monoïque.

(A) Organisation du génome du WMV transformé avec le gène *Vps4*. (B et C) Les résultats de densité optique (DO) issus du prélèvement des feuilles les plus jeunes sont présentés. Les échantillons ont été collectés après 20 dpi. L'accession *Charentais Monoïque* (CM) porte l'allèle *CmVps4*^{wt}. L'accession TGR-1551 porte l'allèle *CmVps4*^{P30R}. L'astérisque représente une différence significative avec le contrôle sensible CM pour $\alpha = 0.05$.

Discussion

Amano et al. (2013) ont montré par des approches génétiques que l'allèle *CsVps4^{zym192-18}* est responsable de la résistance au Potyvirus ZYMV chez le concombre [11]. Mes travaux démontrent le rôle de l'allèle *CmVps4^{P30R}* dans la résistance au Potyvirus WMV chez le melon. Cette étude pourrait permettre le développement d'une nouvelle famille de gène de résistance aux virus à ARN simple-brin de sens positif (ARNsb(+)) infectant les plantes.

La protéine VPS4 est initialement impliquée dans la formation des MVBs chez les cellules Eucaryotes [43]. Le complexe ESCRT auquel VPS4 appartient permet la formation de vésicules à l'intérieur des pré-endosomes à destination de la vacuole [12,44]. Nous avons observé ici la conservation de la protéine VPS4 entre différentes espèces de plantes (Figure 18). De plus, la protéine VPS4 a été observé dans tous les règnes des eucaryotes et également chez les archaea [25]. Au niveau de la structure protéique, nous avons pu observer la forte conservation entre les différentes espèces de plantes du domaine AAA-ATPase de VPS4 (table 1). La pression de sélection conservative sur ce domaine est principalement due à la relation de liaison et d'hydrolyse avec la molécule ATP [27,45]. Le domaine MIT de VPS4 est impliqué dans l'interaction avec plusieurs protéines de l'ESCRT et co-facteurs [29,30,46,47]. Il joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activité de l'ESCRT [48,49]. Une divergence plus grande de ce domaine entre les différents règnes montre une contrainte évolutive moins conservative que pour le domaine AAA-ATPase. Cependant, la co-évolution entre deux ou plusieurs protéines qui interagissent entre elles limitent la permissivité dans l'introduction de variations dans la séquence protéique [50,51]. Cette contrainte est renforcée par le caractère essentiel de la protéine VPS4 observé chez les plantes [12]. C'est ce que nous pouvons observer pour le domaine MIT de VPS4, qui présente un niveau d'identité supérieur à 98% chez l'ensemble des espèces de plantes représentées ici. Le niveau de conservation élevé que nous avons pu observer chez VPS4 répond au besoin pour transposer la résistance au ZYMV identifié chez le concombre chez d'autres espèces de plantes.

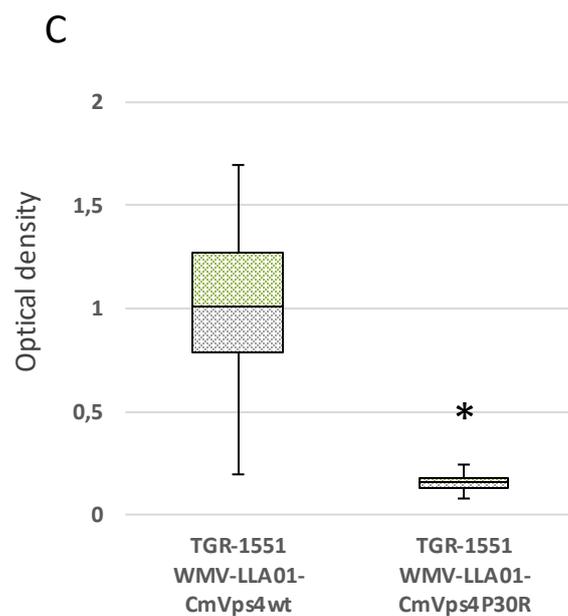
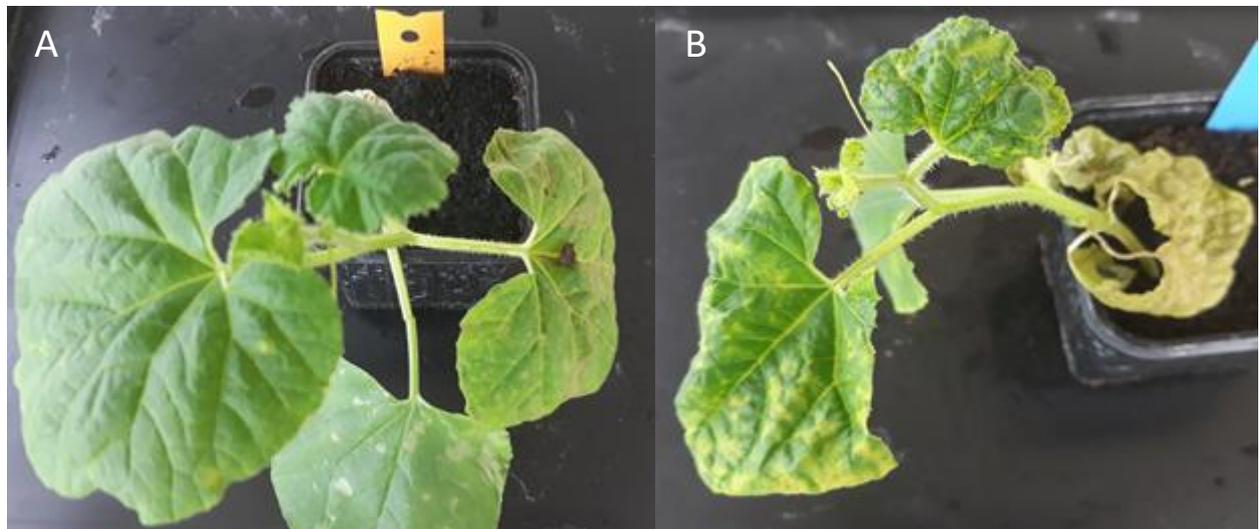


Figure 28 : Accumulation virale des souches de WMV transformées avec le gène *CmVps4* dans TGR-1551.

(A et B) Photos illustratives des symptômes sur les feuilles de l'accession de melon TGR-1551 à 20dpi (jours après inoculation) infectées avec les souches (A) WMV-LLA01-CmVps4wt et (B) WMV-LLA01-CmVps4P30R (C) Les résultats de densité optique (DO) issus du prélèvement des feuilles les plus jeunes sont présentés. Les échantillons ont été collectés après 20 dpi. L'accession TGR-1551 porte l'allèle *CmVps4*^{P30R}. L'astérisque représente une différence significative avec le contrôle sensible CM pour $\alpha = 0.05$.

L'analyse des données disponibles de séquençage de 1184 accessions d'*Arabidopsis thaliana* et de 510 accessions de tomate n'a pas permis d'identifier de substitutions non-synonymes sur le domaine MIT de la protéine VPS4. L'absence de substitution sur le domaine MIT dans la diversité intra-espèce chez *A. thaliana* peut s'expliquer de la même manière que pour la diversité inter-espèces. Le nombre important de partenaires protéique associé au domaine MIT et le caractère essentiel de la fonction porté par la protéine VPS4 induisent une forte pression de sélection sur ce domaine de la protéine [12,29,30,46,47]. Ainsi, peu de substitutions semblent permettre le maintien de la fonction de la protéine. Il est possible que les substitutions sur ce domaine induisent des plantes non viables ou apportent un désavantage sélectif empêchant leur maintien dans la diversité naturelle. Surprenamment, la présence de trois paralogues de VPS4 chez la tomate devrait réduire la pression de sélection et permettre des variations au sein de la diversité de cette espèce. L'absence de diversité sur le domaine MIT des trois paralogues de la tomate peut s'expliquer par une différenciation de la fonction portée par chacun des paralogues pour la protéine VPS4 et, ou, une différenciation de leur expression, impliquant le maintien de la forte pression de sélection pour chacun des paralogues indépendamment.

Le séquençage du gène codant pour la protéine VPS4 de 652 accessions de melon (*Cucumis melo*), espèce proche du concombre (*Cucumis sativus*), a permis d'identifier 3 allèles portant une substitution non-synonyme située sur le domaine MIT (Table 2) [52,53]. Il est possible que la disposition des substitutions sur la position 30 pour les allèles *CmVps4*^{P30R} et *CmVps4*^{P30S} et sur la position 40 pour l'allèle *CmVps4*^{K40R} indique une permissivité plus importante dans cette région de la protéine dans la diversité intra-espèce du melon. La proximité des substitutions identifiées sur l'allèle *CsVps4*^{zym192-18} chez le concombre sur les positions 29 et 33 renforce cette hypothèse. Le maintien de ces substitutions pourrait apporter un avantage sélectif dans l'environnement naturel de ces accessions. Les accessions TGR-1551, PI 482398, PI 482399 portant l'allèle *CmVps4*^{P30R} sont originaires du Zimbabwe. Les virus rapportés infectant les Cucurbitacées dans cette région géographique sont des virus appartenant au groupe IV (virus à ARNsb(+)): le *Cucumber Mosaic Virus* (CMV, genre *Cucumovirus*, famille *Bromoviridae*), le *Squash Mosaic Virus* (SqMV, genre *Comovirus*, famille *Secoviridae*) et le *Watermelon Mosaic Virus* (WMV, genre *Potyvirus*, Famille *Potyviridae*) [54]. Cependant, le ZYMV n'a pas été identifié dans la région Sud et Centrale de l'Afrique à l'exception de l'île de Madagascar [55,56].

Les accessions Humaid 93-4, Humaid 93-10, HSD 2441, HSD 2445, HSD 2446, HSD 2447 et HSD 2458 portant l'allèle *CmVps4*^{K40R} sont originaires du Soudan. Les virus infectant les Cucurbitacées isolés au Soudan appartenant au groupe IV sont le *Melon Rugose Mosaic Virus* (CRMV, genre *Tymovirus*, famille *Tymoviridae*), le *Cucurbit Aphid-borne Yellow Virus* (CABYV, genre *Polerovirus*, famille *Luteoviridae*) et le *Cucumber Mosaic Virus* (CMV, genre *Cucumovirus*, famille *Bromoviridae*) [57–59]. Appartenant au même groupe, ont été identifiés les virus du genre *Potyvirus* (famille *Potyviridae*): le *Papaya Ringspot Virus* (PRSV), *Moroccan Watermelon Mosaic Virus* (MWMV) et le *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV) [60–62]. Le *Watermelon Chlorotic Stunt Virus* (WmCSV, genre *Begomovirus* famille *Geminiviridae*) appartenant au groupe II (virus à ADN) a également été identifié infectant les *Cucurbitaceae* au Soudan [63].

La seule accession identifiée portant l'allèle *CmVps4*^{P30S} est PI 161375 et est originaire de Corée. Les virus infectant les Cucurbitacées isolés en Corée appartenant au groupe IV sont le Cucumber Green Mottle Mosaic Virus (CGMMV, genre *Tobamovirus*, famille *Virgaviridae*) [64], le Zucchini Green Mottle Mosaic Virus (ZGMMV, genre *Tobamovirus*, famille *Virgaviridae*) [65], le Melon Necrotic Spot Virus (MNSV, genre *Carmovirus*, famille *Tombusviridae*) [66] et le *Cucurbit Aphid-borne Yellow Virus* (CABYV, genre *Polerovirus*, famille *Luteoviridae*) [67]. Appartenant au même groupe, ont été identifiés les virus du genre *Potyvirus* (famille *Potyviridae*) : le *Papaya Ringspot Virus* (PRSV), le *Watermelon Mosaic Virus* (WMV) et le *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV) [68–70].

Il est important de relever que ces allèles peuvent également apporter un avantage évolutif dans la résistance à d'autres stress biotiques ou abiotiques. Le faible nombre d'accessions portant des substitutions sur le gène codant pour la protéine VPS4 (12 accessions parmi une collection de 652 accessions) peut, de la même manière que nous l'avons vu pour *A. thaliana* et la tomate, témoigner d'un avantage évolutif faible, voire délétère. Il est également possible que ces substitutions soient issues d'évolutions récentes et donc peu répandues dans la diversité du melon.

Le caractère essentiel de la protéine VPS4 chez les plantes implique que les substitutions identifiées chez le melon maintiennent suffisamment l'activité de la protéine [12]. Les données de cristallographie du domaine MIT de la protéine VPS4b humaine nous ont permis de modéliser la structure du domaine MIT de la protéine VPS4 du melon (figure 19 et 20) [31]. Cette modélisation ne permet pas de mettre en avant des différences dans la structure du domaine MIT entre la VPS4b humaine et la VPS4 du melon malgré un niveau de similarité/identité de 82%/55% (Table S4 à S6). La modélisation ne permet également pas de prédire une modification de la structure du domaine MIT induite par les mutations P30R, P30S et K40R. Les prédictions de structure protéique sont réalisées par comparaison des structures cristallographiques. A ce jour, le domaine MIT est un domaine dont la structure est peu connue à l'exception de la VPS4 humaine et il n'existe pas d'autres structures proches de celle du MIT ayant été cristallographié. Ainsi la modélisation de la VPS4 du melon prend comme référence uniquement la VPS4 humaine et génère un modèle identique. Nous avons particulièrement pu observer cette contrainte dans la modélisation lors de la prédiction de la structure du domaine MIT pour les allèles *CmVps4*^{P30R} et *CmVps4*^{P30S} avec la substitution d'une proline ne

modifiant pas l'hélice alpha sur laquelle elle se trouve. Il est cependant possible que les substitutions identifiées sur ce domaine aient non seulement modifié l'encombrement stérique de la structure protéique mais également sa charge [71,72]. Une résistance au virus qui serait induite par ces substitutions serait donc possiblement due à une perte de fonction cellulaire nécessaire à la réplication du virus. Le maintien de la fonction ESCRT étant essentiel pour la cellule de plante, il s'agirait d'une perte de fonction sur un mécanisme non-décrit de la protéine VPS4 autre que l'ESCRT. Une autre possibilité étant qu'une résistance induite par ces substitutions soient due à une perte d'interaction avec une protéine virale.

Le phénotypage des accessions portant les allèles *CmVps4*^{P30R} et *CmVps4*^{P30S} n'ont montré aucune résistance à la souche ZYMV-R5A (figure 21). Les accessions portant l'allèle *CmVps4*^{K40R} ne sont également pas résistantes à cette souche à l'exception de Humaid 93-4. Ainsi, nous pouvons affirmer que les allèles de *Vps4* identifiés n'induisent pas de résistance au ZYMV-R5A et que la résistance chez Humaid 93-4 à ce virus n'est pas associée à la substitution K40R de la protéine VPS4.

La résistance au WMV est peu courante chez le melon. Seules quelques accessions ont été décrites partiellement résistantes au WMV et les gènes responsables ne sont pas identifiés. Parmi celles-ci, l'accession TGR-1551 est présentée dans la littérature comme résistante au WMV [21,73]. Cette résistance a été caractérisée vis-à-vis de plus de 21 souches de WMV [74,75]. Le locus *wmv1551* responsable de la résistance au WMV chez TGR-1551 a été cartographié sur le chromosome 11. Ce locus contient plus de 100 gènes candidats pour la résistance au WMV dont le gène codant pour VPS4 fait partie.

Les 4 accessions portant l'allèle *CmVps4*^{P30R} : TGR-1551, IVT 2365, PI 482398 et PI 482399 ont montrées le même phénotype de résistance à la souche WMV-fr (figure 22). De plus, le phénotypage d'une partie des accessions portant l'allèle *CmVps4*^{K40R} : Humaid 93-4, HSD 2441, HSD 2445 et Humaid 93-10 a également montré le même phénotype de résistance au WMV (figure 23). Ces résultats sont surprenants car le WMV n'a pas été identifié au Soudan [57–63]. Il est donc possible que le virus n'ait pas été détecté jusqu'à présent dans cette région. Une autre possibilité étant que la résistance au WMV soit due à la résistance à un autre virus présent au Soudan tel que le PRSV ou le MWMV, qui appartiennent au même genre Potyvirus que le WMV. Cela impliquerait un facteur de sensibilité chez l'hôte commun aux deux virus.

Seule l'accèsion PI 161375, portant l'allèle *CmVps4*^{P30S}, ne montre pas de résistance au WMV (figure 21). Cette substitution ne conférant de résistance ni au WMV ni au ZYMV, il est possible que le changement P30S de VPS4 n'apporte pas d'avantage évolutif. Cependant, le niveau de conservation observé pour le domaine MIT de la protéine VPS4 permet de considérer l'hypothèse qu'un autre avantage évolutif soit à l'origine du maintien de cette substitution. L'insertion des allèles codant pour les allèles *CmVps4*^{P30R} et *CmVps4*^{K40R} dans un melon sensible au WMV par transformation génétique stable et la suppression de l'endogène est rendu impossible par la faible efficacité actuelle des techniques de transformation chez le melon [76,77]. Pour confirmer le rôle joué par VPS4 dans la résistance au WMV, une collection de melon mutagénisée à l'EMS a été utilisée [22]. Le crible de cette collection de 6000 familles M2 a permis d'identifier 13 familles portant une mutation non-synonyme et aucune mutation non-sens. Ces mutations sont localisées sur les inter-domaines, le domaine AAA-ATPase et le domaine C-ter de VPS4 (figure 24). L'absence de mutation non-synonyme sur le domaine MIT renforce l'observation d'une pression de sélection forte pour le domaine MIT. Par ailleurs, les mutations induites par EMS sont hétérozygotes. L'absence de mutations non-synonymes détectées sur le domaine MIT ou de mutations non-sens, même à l'état hétérozygote semble indiquer que le gène *CmVps4* est également essentiel au stade gamétophytique [78,79].

Le phénotypage que nous avons réalisé sur les familles EMS portant une mutation sur le gène codant pour la protéine VPS4 ne montrent pas de résistance au ZYMV. Il en est de même pour le phénotypage de ces familles pour la résistance au WMV, à l'exception de la famille CmEMS P223S (figure 25). Nous avons cependant montré que la résistance n'était pas due à la mutation qui conduit au changement P223S, localisé sur le domaine AAA-ATPase de VPS4 (figure 26). Ainsi, les résultats sur la collection EMS ne nous permettent pas de montrer le rôle joué par les mutations sur VPS4 dans la résistance au WMV. De plus, il est possible que seules des mutations sur le domaine MIT de VPS4 puissent induire une résistance au ZYMV ou au WMV. Une approche par cartographie génétique pourrait permettre d'identifier de nouveaux gènes candidats dans la résistance au WMV chez la famille CmEMS P223S [22].

Le développement de virus de plantes vecteurs de gènes pour l'expression de protéines est un outil complétant la sélection et la transformation transgénique conventionnelles. L'expression transitoire par rapport à l'expression des gènes transgéniques par le biais de virus sont une réalisation des constructions rapide, l'intégration des gènes dans le génome viral étant intégralement in vitro, et peut être utilisé pour une application dans diverses espèces de plantes [80]. Ces caractéristiques sont particulièrement avantageuses lorsque les gènes d'intérêt sont essentiels pour la plante, bien que l'instabilité du gène étranger dans le génome viral puisse poser certains problèmes de stabilité ou d'infectiosité. Les stratégies qui ont été testées pour l'expression de gènes étrangers dans divers vecteurs à base de virus comprennent le remplacement de gènes, l'insertion de gènes, la présentation d'épitopes, l'utilisation de cassettes d'expression génique contrôlées par des virus et la complémentation [80–83].

Nous avons utilisé cette approche de complémentation pour restaurer la sensibilité au WMV chez l'accèsion TGR-1551. Les résultats obtenus montrent que la souche WMV-*CmVps4*^{wt} est capable d'infecter la plante TGR-1551 et de provoquer l'apparition de symptômes sévères (figure 27 et 28). L'infection par la souche WMV-*CmVps4*^{P30R} ne conduit, quant à elle, à aucun symptôme et à une très faible accumulation virale. La seule présence de la protéine CmVPS4^{wt} dans l'accèsion TGR-1551 est suffisante pour restaurer la sensibilité. On peut ainsi confirmer que la substitution P30R sur la protéine CmVPS4 est responsable de la résistance au WMV. La résistance au WMV induite par cette substitution est la première résistance au WMV caractérisé chez le melon. Cette résistance récessive est codée par une unique substitution sur le gène *Vps4*. Cependant, les mécanismes impliqués restent inconnus. Le rôle de l'ESCRT dans la réplication du WMV, et plus généralement des Potyvirus n'est pas décrit dans la littérature. Seule la résistance au ZYMV identifié chez le concombre impliquant un allèle de *Vps4* montre l'implication de ce gène dans la réplication des Potyvirus [11].

Lors de la réplication, la formation de vésicules virales a été observée chez tous les virus à ARNs(+). L'implication de l'ESCRT dans la formation de ces vésicules a été montrée pour le BMV (*Bromovirus*) et le TBSV (*Tombusvirus*) [14,84]. Ces vésicules ont la particularité de se former dans le lumen du Réticulum Endoplasmique (ER) et du peroxyosome pour le BMV et TBSV respectivement [85,86]. Les vésicules virales des Potyvirus ont été identifiées au niveau des chloroplastes [87]. Ces vésicules sont cependant issues du ER, formées par le mécanisme COPII puis détournées par la protéine virale 6K2 en direction des chloroplastes. Le mécanisme associé à l'internalisation du génome viral dans les vésicules du ER est inconnu. Nous pensons que l'ESCRT joue un rôle dans la formation de vésicules contenant le génome viral dans le lumen du ER.

Références :

- [1] Sevik MA, Arli-Sokmen M. Viruses infecting cucurbits in Samsun, Turkey. *Plant Dis* 2003;87:341–4. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.4.341>.
- [2] Kousik CS, Adkins S, Turechek WW, Webster CG, Webb SE, Baker CA, et al. Progress and challenges in managing watermelon vine decline caused by whitefly-transmitted Squash Vein Yellowing Virus (SqVYV). *Isr J Plant Sci* 2012;60:435–45. <https://doi.org/10.1560/IJPS.60.4.435>.
- [3] Pitrat M. Melon. *Biotechnol Agric For* 2007;60:209–40. https://doi.org/10.1007/978-3-540-49161-3_9.
- [4] Lecoq H, Desbiez C. Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region. *An Ever-Changing Picture*. vol. 84. 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00003-8>.
- [5] Bastet A, Robaglia C, Gallois JL. eIF4E Resistance: Natural Variation Should Guide Gene Editing. *Trends Plant Sci* 2017;22:411–9. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.01.008>.
- [6] Sanfaçon H. Plant translation factors and virus resistance. *Viruses* 2015;7:3392–419. <https://doi.org/10.3390/v7072778>.
- [7] Dogimont C. 2011 Gene List for Melon. *Cucurbit Genet Coop Rep* 33-34 2011;133:104–33.
- [8] Brotman Y, Normantovich M, Goldenberg Z, Zvirin Z, Kovalski I, Stovbun N, et al. Dual resistance of melon to fusarium oxysporum races 0 and 2 and to papaya ring-spot virus is controlled by a pair of head-to-head-oriented nb-lrr genes of unusual architecture. *Mol Plant* 2013;6:235–8. <https://doi.org/10.1093/mp/sss121>.
- [9] Díaz JA, Mallor C, Soria C, Camero R, Garzo E, Fereres A, et al. Potential sources of resistance for melon to nonpersistently aphid-borne viruses. *Plant Dis* 2003;87:960–4. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.8.960>.
- [10] EKBIC E, FIDAN H, YILDIZ M, ABAK K. Screening of Turkish Melon Accessions for Resistance to ZYMV, WMV and CMV. *Not Sci Biol* 2010;2:55–7. <https://doi.org/10.15835/nsb213555>.
- [11] Amano M, Mochizuki A, Kawagoe Y, Iwahori K, Niwa K, Svoboda J, et al. High-resolution mapping of zym, a recessive gene for Zucchini yellow mosaic virus resistance in cucumber. *Theor Appl Genet* 2013;126:2983–93. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2187-5>.
- [12] Haas TJ, Sliwinski MK, Martinez DE, Preuss M, Ebine K, Ueda T, et al. The Arabidopsis AAA ATPase SKD1 Is Involved in Multivesicular Endosome Function and Interacts with Its Positive Regulator LYST-INTERACTING PROTEIN5. *Plant Cell Online* 2007;19:1295–312. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.049346>.
- [13] Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery. *Curr Biol* 2012;22:R116–20. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.028>.
- [14] Diaz A, Zhang J, Ollwerther A, Wang X, Ahlquist P. Host ESCRT proteins are required for bromovirus RNA replication compartment assembly and function. *PLoS Pathog* 2015;11:e1004742. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004742>.
- [15] Kovalev N, Martín IF de C, Pogany J, Barajas D, Pathak K, Risco C, et al. The role of viral RNA and co-opted cellular ESCRT-I and ESCRT-III factors in formation of tombusvirus spherules harboring the tombusvirus replicase. *J Virol* 2016;90:JV1.02775-15. <https://doi.org/10.1128/JVI.02775-15>.

- [16] De Castro IF, Volonté L, Risco C. Virus factories: Biogenesis and structural design. *Cell Microbiol* 2013;15:24–34. <https://doi.org/10.1111/cmi.12029>.
- [17] Verchot J. Wrapping membranes around plant virus infection. *Curr Opin Virol* 2011;1:388–95. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.09.009>.
- [18] Laliberté J-F, Zheng H. Viral Manipulation of Plant Host Membranes. *Annu Rev Virol* 2014;1:237–59. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085532>.
- [19] Movahed N, Cabanillas DG, Wan J, Vali H, Laliberté JF, Zheng H. Turnip mosaic virus components are released into the extracellular space by vesicles in infected leaves. *Plant Physiol* 2019;180:1375–88. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00381>.
- [20] Nelissen H, Moloney M, Inzé D. Translational research: From pot to plot. *Plant Biotechnol J* 2014;12:277–85. <https://doi.org/10.1111/pbi.12176>.
- [21] Palomares-Rius FJ, Viruel MA, Yuste-Lisbona FJ, Lopez-Sese AI, Gomez-Guillamon ML. Simple sequence repeat markers linked to QTL for resistance to Watermelon mosaic virus in melon. *Theor Appl Genet* 2011;123:1207–14. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1660-2>.
- [22] Dahmani-Mardas F, Troadec C, Boualem A, Lévêque S, Alsadon AA, Aldoss AA, et al. Engineering melon plants with improved fruit shelf life using the TILLING approach. *PLoS One* 2010;5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015776>.
- [23] Hull R. Mechanical inoculation of plant viruses. *Curr Protoc Microbiol* 2009;6–9. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc16b06s13>.
- [24] Chang AY, Chau VW, Landas JA, Pang Y. Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI Methods* 2017;1:22–5.
- [25] Ettema TJG, Bernander R. Cell division and the ESCRT complex: A surprise from the archaea. *Commun Integr Biol* 2009;2:86–8. <https://doi.org/10.4161/cib.7523>.
- [26] Leung KF, Dacks JB, Field MC. Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic* 2008;9:1698–716. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00797.x>.
- [27] Ogura T, Whiteheart SW, Wilkinson AJ. Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases. *J Struct Biol* 2004;146:106–12. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.11.008>.
- [28] Patel S, Latterich M. The AAA team: Related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol* 1998;8:65–71. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(97\)01212-9](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(97)01212-9).
- [29] Obita T, Saksena S, Ghazi-Tabatabai S, Gill DJ, Perisic O, Emr SD, et al. Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* 2007;449:735–9. <https://doi.org/10.1038/nature06171>.
- [30] Azmi IF, Davies BA, Xiao J, Babst M, Xu Z, Katzmann DJ. ESCRT-III Family Members Stimulate Vps4 ATPase Activity Directly or via Vta1. *Dev Cell* 2008;14:50–61. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.10.021>.
- [31] Scott A, Chung H-Y, Gonciarz-Swiatek M, Hill GC, Whitby FG, Gaspar J, et al. Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins. *EMBO J* 2005;24:3658–69. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600818>.
- [32] Weigel D, Mott R. The 1001 genomes project for *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol* 2009;10:107. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-5-107>.
- [33] Mueller LA, Solow TH, Taylor N, Skwarecki B, Buels R, Binns J, et al. The SOL Genomics Network. A Comparative Resource for Solanaceae Biology and Beyond. *IEEE J Solid-State Circuits* 2013;48:2323–37. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060707.1310>.
- [34] Serres-Giard L.; Dogimont C. How microsatellite diversity helps to understand the

- domestication history of melon. *Proc Xth EUCARPIA Meet Genet Breed Cucurbitaceae* 2012;254–63.
- [35] Gonzalo MJ, Claveria E, Monforte AJ, Dolcet-Sanjuan R. Parthenogenic Haploids in Melon: Generation and Molecular Characterization of a Doubled Haploid Line Population. *J Am Soc Hortic Sci* 2011;136:145–54. <https://doi.org/10.21273/jashs.136.2.145>.
- [36] MacArthur MW, Thornton JM. Influence of proline residues on protein conformation. *J Mol Biol* 1991;218:397–412. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90721-H](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90721-H).
- [37] Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Philo JS, Arakawa T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog* 2004;20:1301–8. <https://doi.org/10.1021/bp0498793>.
- [38] Wang S, Li W, Liu S, Xu J. RaptorX-Property: a web server for protein structure property prediction. *Nucleic Acids Res* 2016;44:W430–5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw306>.
- [39] Wang S, Ma J, Xu J. AUCpred: Proteome-level protein disorder prediction by AUC-maximized deep convolutional neural fields. *Bioinformatics* 2016;32:i672–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw446>.
- [40] Wang S, Sun S, Xu J. AUC-Maximized Deep Convolutional Neural Fields for Protein Sequence Labeling 2016;1:426–41. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46227-1>.
- [41] Wang S, Peng J, Ma J, Xu J. Protein Secondary Structure Prediction Using Deep Convolutional Neural Fields. *Sci Rep* 2016;6:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep18962>.
- [42] Périn C, Hagen LS, De Conto V, Katzir N, Danin-Poleg Y, Portnoy V, et al. A reference map of Cucumis melo based on two recombinant inbred line populations. *Theor Appl Genet* 2002;104:1017–34. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0864-x>.
- [43] Hurley JH. ESCRTs are everywhere. *EMBO J* 2015;34:2398–407. <https://doi.org/10.15252/embj.201592484>.
- [44] Barajas D, Martín IF de C, Pogany J, Risco C, Nagy PD. Noncanonical Role for the Host Vps4 AAA+ ATPase ESCRT Protein in the Formation of Tomato Bushy Stunt Virus Replicase. *PLoS Pathog* 2014;10:24–32. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004087>.
- [45] Campbell X. Proteins : From Chemical Properties to Cellular Function : A Practical Review of Actin Dynamics 2017.
- [46] Scott A, Gaspar J, Stuchell-Brereton MD, Alam SL, Skalicky JJ, Sundquist WI. Structure and ESCRT-III protein interactions of the MIT domain of human VPS4A. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:13813–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502165102>.
- [47] Sarah M. Rue, Sara Mattei, Suraj Saksena and SDE. Novel Ist1-Did2 Complex Functions at a Late Step in Multivesicular Body Sorting. *Mol Biol Cell* 2007;19:308–17. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07>.
- [48] Dimaano, Christian, Charles B. Jones, Abraham Hanono, Matt Curtiss and MB. Ist1 Regulates Vps4 Localization and Assembly. *Mol Biol Cell* 2007;19:308–17. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07>.
- [49] Brian A. Davies, Markus Babst and DJK. Regulation of Vps4 during MVB Sorting and Cytokinesis. *Growth (Lakeland)* 2008;23:1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- [50] Mintseris J, Weng Z. Structure, function, and evolution of transient and obligate protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:10930–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502667102>.
- [51] Pazos F, Valencia A. Protein co-evolution, co-adaptation and interactions. *EMBO J*

- 2008;27:2648–55. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.189>.
- [52] Sebastian P, Schaefer H, Telford IRH, Renner SS. Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:14269–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005338107>.
- [53] Bisognin DA. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciência Rural* 2002;32:715–23. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000400028>.
- [54] Nyamupingidza TN, Machakaire V. Virus diseases of important vegetables in Zimbabwe. *Plant Virol Sub-Saharan Africa* 2001:397–405.
- [55] Desbiez C, Lecoq H. Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathol* 1997;46:809–29. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-87.x>.
- [56] Ali A. Epidemiology and evolution of potyviruses infecting cucurbits. *INC*; 2020. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818654-1.00028-1>.
- [57] Mahgoub HA, Wipf-Scheibel C, Delécolle B, Pitrat M, Dafalla G, Lecoq H. Melon rugose mosaic virus: Characterization of an isolate from Sudan and seed transmission in melon. *Plant Dis* 1997;81:656–60. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.6.656>.
- [58] Lecoq H, Dafalla GA, Mohamed YF, Ali HM, Wipf-Scheibe C, Desbiez C, et al. Survey of Virus Diseases Infecting Cucurbit Crops in Eastern, Central and Western Sudan. vol. 2. 1994. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [59] Magid AGMA. Host Range and Transmission of Anisolate of Cucumber Mosaic Virus from the Sudan. *East African Agric For J* 1990;56:63–7. <https://doi.org/10.1080/00128325.1990.11663129>.
- [60] Mohammed H, Manglli A, Zicca S, El Hussein A, Mohamed M, Tomassoli L. First report of Papaya ringspot virus in pumpkin in Sudan. *New Dis Reports* 2012;26:26. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2012.026.026>.
- [61] Lecoq H, Dafalla G, Desbiez C, Wipf-Scheibel C, Delécolle B, Lanina T, et al. Biological and molecular characterization of Moroccan watermelon mosaic virus and a potyvirus isolate from Eastern Sudan. *Plant Dis* 2001;85:547–52. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.5.547>.
- [62] Mahgoub HA, Desbiez C, Wipf-Scheibel C, Dafalla G, Lecoq H. Characterization and occurrence of Zucchini yellow mosaic virus in Sudan. *Plant Pathol* 1997;46:800–5. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-56.x>.
- [63] Kheyr-Pour A, Bananej K, Dafalla GA, Caciagli P, Noris E, Ahoonmanesh A, et al. Watermelon chlorotic stunt virus from the Sudan and Iran: Sequence comparisons and identification of a whitefly-transmission determinant. *Phytopathology* 2000;90:629–35. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2000.90.6.629>.
- [64] Yoon JY, Choi GS, Choi SK, Hong JS, Choi JK, Kim W, et al. Molecular and biological diversities of Cucumber green mottle mosaic virus from cucurbitaceous crops in Korea. *J Phytopathol* 2008;156:408–12. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01376.x>.
- [65] Choi G-S. Occurrence of two tobamovirus diseases in cucurbits and control measures in Korea. *Plant Pathol J* 2001;17:243–8.
- [66] Kwak HR, Kim JS, Cho JD, Lee JH, Kim TS, Kim MK, et al. Characterization of Melon necrotic spot virus occurring on watermelon in Korea. *Plant Pathol J* 2015;31:379–87. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2014.0124>.
- [67] Choi SK, Yoon JY, Choi GS. Biological and molecular characterization of a Korean isolate of Cucurbit aphid-borne yellows virus infecting cucumis species in Korea. *Plant*

- Pathol J 2015;31:371–8. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.06.2015.0103>.
- [68] Kim J-E, Kwak H-R, Choi H-S, Kim M. First report of Watermelon mosaic virus on *Malva verticillata* in Korea 2018;103:380.
- [69] Kwon SW, Kim MS, Choi HS, Kim KH. Biological characteristics and nucleotide sequences of three Korean isolates of Zucchini yellow mosaic virus. *J Gen Plant Pathol* 2005;71:80–5. <https://doi.org/10.1007/s10327-004-0165-0>.
- [70] Jin T-S, Kim S-M, Ko S-J, Lee S-H, Choi H-S, Park J-W, et al. Occurrence of Papaya ringspot virus infecting cucurbit crops in Korea. *Korean J Pestic Sci* 2009;13:298–308.
- [71] Lam CW, Arlt W, Chan CK, Honour JW, Lin CJ, Tong SF, et al. Mutation of proline 409 to arginine in the meander region of cytochrome P450c17 causes severe 17 α -hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 2001;72:254–9. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3134>.
- [72] Xu D, Enroth C, Lindqvist Y, Ballou DP, Massey V. Studies of the mechanism of phenol hydroxylase: Effect of mutation of proline 364 to serine. *Biochemistry* 2002;41:13627–36. <https://doi.org/10.1021/bi020446n>.
- [73] Pérez-de-Castro A, Esteras C, Alfaro-Fernández A, Daròs JA, Monforte AJ, Picó B, et al. Fine mapping of wmv 1551, a resistance gene to Watermelon mosaic virus in melon. *Mol Breed* 2019;39. <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0998-z>.
- [74] Díaz-Pendón JA, Fernández-Muñoz R, Gómez-Guillamón ML, Moriones E. Inheritance of Resistance to Watermelon mosaic virus in *Cucumis melo* that Impairs Virus Accumulation, Symptom Expression, and Aphid Transmission. *Phytopathology* 2005;95:840–6. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0840>.
- [75] Gonzalez-Ibeas D, Canizares J, Aranda M a. Microarray Analysis Shows That Recessive Resistance to Watermelon mosaic virus in Melon Is Associated with the Induction of Defense Response Genes. *Mol Plant-Microbe Interact* 2012;25:107–18. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-11-0193>.
- [76] Çürük S, Çetiner S, Elman C, Xia X, Wang Y, Yeheskel A, et al. Transformation of recalcitrant melon (*Cucumis melo* L.) cultivars is facilitated by wounding with carborundum. *Eng Life Sci* 2005;5:169–77. <https://doi.org/10.1002/elsc.200520069>.
- [77] Pech JC, A. Bernadac, M. Bouzayen, A. Latche, Dogimont C, Pitrat M, et al. Transgenic Crops V : Melon. *Biotechnol Agric For* 2007;60.
- [78] Johnson MA, Von Besser K, Zhou Q, Smith E, Aux G, Patton D, et al. Arabidopsis hapless mutations define essential gametophytic functions. *Genetics* 2004;168:971–82. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.029447>.
- [79] Qin G, Ma Z, Zhang L, Xing S, Hou X, Deng J, et al. Arabidopsis AtBECLIN1/AtAtg6/AtVps30 is essential for pollen germination and plant development. *Cell Res* 2007;17:249–63. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.7>.
- [80] Scholthof HB, Scholthof KBG, Jackson AO. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu Rev Phytopathol* 1996;34:299–323. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.299>.
- [81] Fuerst TR, Niles EG, Studier FW, Moss B. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:8122–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.21.8122>.
- [82] Hahn CS, Hahn YS, Braciale TJ, Rice CM. Infectious Sindbis virus transient expression vectors for studying antigen processing and presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2679–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2679>.
- [83] Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y. Systemic *Agrobacterium*

- tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol* 2005;23:718–23. <https://doi.org/10.1038/nbt1094>.
- [84] Kovalev N, Inaba JI, Li Z, Nagy PD. The role of co-opted ESCRT proteins and lipid factors in protection of tombusviral double-stranded RNA replication intermediate against reconstituted RNAi in yeast. *PLoS Pathog* 2017;13:1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006520>.
- [85] Li J, Fuchs S, Zhang J, Wellford S, Schuldiner M, Wang X. An unrecognized function for COPII components in recruiting the viral replication protein BMV 1a to the perinuclear ER. *J Cell Sci* 2016;129:3597–608. <https://doi.org/10.1242/jcs.190082>.
- [86] McCartney AW, Greenwood JS, Fabian MR, White KA, Mullen RT. Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *Plant Cell* 2005;17:3513–31. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036350>.
- [87] Wei T, Wang A. Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *J Virol* 2008;82:12252–64. <https://doi.org/10.1128/JVI.01329-08>.

CHAPITRE III

IDENTIFICATION DES INTERACTIONS ENTRE LA PROTEINE 6K2 ET LES PROTEINE DE L'ESCRT

Introduction

La réplication des virus à ARN simple brin positif (ARNsb(+)) est associée à des changements structuraux des endomembranes des cellules [1,2]. Ces virus induisent la formation de vésicules et des quasi-organites, intégrant les complexes de répliquons viraux (VRC). Les origines des vésicules et leurs destinations finales sont différentes selon le virus. Au cours de la réplication du *Brome mosaic virus* (BMV, famille des *Bromovirus*), il a été observé l'implication de l'ESCRT dans la formation des vésicules, au niveau du réticulum endoplasmique (ER) [3,4]. Cela témoigne du détournement de l'activité initiale de l'ESCRT des Multivesicular bodies (MVBs) vers le ER. L'interaction directe entre la protéine ESCRT-III SNF7 et le BMV a été montrée comme essentielle à la réplication du virus [3]. Le rôle de l'ESCRT-I et ESCRT-II dans la formation des vésicules virales suggère l'implication d'autres protéines ou co-facteurs de l'ESCRT. Des protéines SNARE et ESCRT, dont VPS4, jouent également un rôle dans la réplication du *Tomato bushy stunt virus* (TBSV, famille des *Tombusvirus*) [5,6]. Des vésicules virales ont été observées dans le lumen des peroxysomes en maintenant des ouvertures avec le cytoplasme. Des vésicules virales issues des peroxysomes semblent également se déplacer vers des pre-peroxysomes dérivés du ER [7].

Chez les Potyvirus, le *Turnip Mosaic Virus* (TuMV) est le principal modèle utilisé pour décrire la formation de vésicules dans les cellules de plantes infectées. Des vésicules virales ont été localisées dans le ER, les chloroplastes, les MVBs, la vacuole et l'apoplasme [8–11]. La protéine virale 6K2 a été montrée comme responsable de l'externalisation des vésicules virales localisées dans le ER par une interaction avec la protéine COPII SEC24a [12]. Ces vésicules sont détournées de la voie COPII. Les protéines SNARE VTI11 et SEC22 semblent impliquées dans l'adressage au MVBs et à la vacuole [13]. Cependant, les mécanismes associés à l'internalisation des vésicules dans le ER et les MVBs ne sont pas connus. L'ESCRT est le seul mécanisme décrit associé à la formation de vésicules lumineales.

L'implication de l'ESCRT dans la réplication des Potyvirus a été mise en évidence uniquement pour le ZYMV chez le concombre, une résistance étant associée à des substitutions dans le gène codant pour VPS4 [14] et dans la résistance au WMV chez le melon, comme le montrent les résultats présentés dans le **CHAPITRE II**.

A ce jour, plusieurs dizaines d'interactions ont été démontrées entre les protéines exprimées par les Potyvirus et les protéines de l'hôte [15]. Ces tests d'interactions ont été mis en place majoritairement par une approche en double hybride dans la levure. Cette technique implique, lors de l'interaction entre les deux protéines candidates, le mouvement du complexe vers le noyau afin d'induire le gène rapporteur [16].

Dans le cas où une des protéines candidates est associée à la membrane, le complexe ne peut se déplacer vers le noyau et le résultat obtenu peut être un faux négatif. Cela explique l'absence d'interaction mise en évidence impliquant des protéines transmembranaires issues des mécanismes de déformation des membranes. Pour les protéines virales transmembranaires 6K1 et 6K2, on constate également l'absence d'interaction mise en évidence par ces approches.

Cette dernière décennie, l'utilisation d'une approche de crible d'interaction adaptée aux protéines membranaires, appelée double hybride dans la levure en split-ubiquitine (SU-Y2H) a permis d'identifier des interactions avec les protéines transmembranaires. Ainsi, il a été montré l'interaction de la protéine transmembranaire p33 exprimé par le TBSV avec des protéines de l'ESCRT et des protéines SNARE [17,18]. De la même manière, il a été montré l'interaction de la protéine associée à la membrane 2a exprimé par le BMV avec des protéines de l'ESCRT [3].

Chez le Potyvirus TuMV, cette approche a permis de démontrer l'interaction de 6K2 avec la protéine de l'hôte COPII-Sec24a [12]. Afin de mieux comprendre le rôle de l'ESCRT dans la réplication et la résistance au WMV chez le melon, dans le **CHAPITRE III**, nous recherchons des interactions entre les protéines virales du WMV et les protéines de l'ESCRT du melon. Pour cela, nous avons mis en place une approche en SU-Y2H, en utilisant les protéines virales transmembranaires 6K1 et 6K2, comme appâts. En utilisant une seconde approche d'interaction, nous avons cherché à confirmer certaines des interactions identifiées.

Matériels et Méthodes

Matériel bactérien et traitements

Les souches de bactéries *Escherichia coli* DH5 α et Stellar™ HST08 ont été utilisées pour le clonage et le stockage de plasmides. Les bactéries DH5 α ont été rendu compétentes en suivant le protocole décrit dans Y. Pang *et al.*, 2017 [19]. La transformation des bactéries DH5 α et HST08® a été réalisée en suivant le protocole de transformation de bactéries thermo-compétentes fourni par Clontech®. Une culture liquide de LB contenant les bactéries cultivées à 37°C pendant 24h a été utilisée pour l'extraction ADN et le stockage. L'extraction d'ADN a été réalisée en suivant le protocole du kit d'extraction Quiaprep® fourni par Quiagen™. Le stockage a été réalisé en ajoutant du glycérol 50% à un volume 1:1 (Culture:Glycérol) avant congélation à une température de -80°C. Les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* sont transformées par électroporation. Le protocole utilisé est adapté de celui proposé par Binns *et al.*, (2006) [20]. L'agro-infiltration des tissus de *Nicotiana benthamiana* via *A. tumefaciens* a été réalisée en utilisant des pré-cultures en phase de croissance. Le milieu des cultures est lavé par centrifugation et le culot re-suspendu dans un milieu à 150 μ M d'Acetosyringone et du MES à 1mM. Des seringues jetables ont été utilisées pour infiltrer dans les feuilles le milieu contenant les bactéries comme présenté dans Fernie *et al.*, (2020) [21]. Une souche d'*A. tumefaciens* permettant l'expression transitoire de l'inhibiteur de silencing P19 a été ajoutée à chaque agro-infiltration (Voinnet *et al.*, 2003). Les autres plasmides utilisés pour l'agro-infiltration sont listés dans la table S3.

Transformation des levures

Des cultures fraîches en milieu liquide YPD sont utilisées pour réaliser la transformation des levures. A DO = 0.032, les levures sont centrifugées à 2500 rpm et re-suspendues dans de l'eau stérile. Une autre étape de centrifugation et re-suspension dans le tampon TE/LiAc est réalisée à 2 reprises. La re-suspension se fait à volume nécessaire pour obtenir une concentration d'environ 50.10⁹ cell.mL⁻¹. Pour chaque co-transformation, sont mélangés 100 μ L du milieu contenant les levures, 10 μ L de « DNA carrier » à 10 mg.mL⁻¹, 600 μ L de PEG/LiAc et 500 ng de

chaque plasmide. Le mix est incubé 30 minutes à 30°C. Le choc thermique est réalisé en ajoutant 75 µL de DMSO, puis 15 minutes à 42°C, directement suivi de 1 minute dans la glace. Les levures sont ensuite étalées sur milieu sélectif et cultivées à 30°C.

Biologie moléculaire

Les PCR ont été réalisées en utilisant la polymérase GoTaq ou Herculase et en suivant le protocole fourni par Promega. Les extractions sur gel ont été réalisées en utilisant le kit d'extraction gel QIAquick® et le protocole fourni par QIAGEN. Les primers utilisés pour l'amplification de *AtVps4* sont listés dans la table S3. Les constructions réalisées par clonage Gateway ont été réalisées avec le plasmide pENTR™ Directional TOPO® et en suivant le protocole du fournisseur Invitrogen. Les plasmides d'expression utilisés sont listés dans la table S3.

Solutions et milieux

Le milieu YPD liquide est composé de 1% d'extrait de levure, 2% de Bacto™ peptone et 2% de D-glucose. Pour obtenir le YPD solide, il a été ajouté 2% de Bacto™ agar. Le milieu de sélection des levures transformées est composé de « Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids » fourni par Sigma Aldrich. Les acides aminés Leucine, Thréonine, Histidine et Acide aspartique sont rajoutés en fonction des conditions de sélection nécessaires. Les antibiotiques de sélection utilisés pour le clonage sont la kanamycine et l'ampicilline dans les concentrations indiquées dans le protocole du fournisseur Sigma-Aldrich. La solution PEG/LiAc est composée à 80% de solution mère PEG4000 à 50% et de 10% des solutions mères TE 10X et LiAc 10X.

Microscopie confocale

Les observations de l'interaction *AtVps4* avec 6K2^{TuMV} dans les plantes infectées avec le TuMV-6K2mcherry et la localisation subcellulaire des fusions *AtVps4*-RFP et *AtVps4*-GFP, ont été réalisées 3 à 4 jours après l'agro-infiltration à l'aide d'un microscope confocal ZeissAxio Imager.Z2 AirscanLMS880, objectifs sous 10X et 63X. Le laser argon à 488 nm a été utilisé pour détecter YFP (longueur d'onde d'excitation maximale à 514 nm et longueur d'onde d'émission à 530 nm) et la GFP (longueur d'onde

d'excitation à 488 nm de longueur d'onde d'émission à 507 nm). Le laser Argon à 514 nm a été utilisé pour détecter les RFP (longueur d'onde d'excitation à 555 nm et longueur d'onde d'émission à 584 nm). Le laser DPSS 561 nm a été utilisé pour détecter la mCherry (longueur d'onde d'excitation à 585 nm et longueur d'onde d'émission à 611 nm). Le mode Lambda a été utilisé pour contrôler la signature spectrale du signal fluorescent dans les images confocales. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) [22].

Résultats

Mise au point de l'approche SU-Y2H et validation des constructions appâts

Afin de réaliser un crible d'interaction entre les protéines virales et l'ESCRT, nous avons établi une liste de constructions adaptées au SU-Y2H. L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés. Elle est présente chez tous les organismes eucaryotes et est utilisée comme outil de signalisation par les cellules. L'ubiquitine se fixe sur des résidus d'autres protéines pour réguler notamment les voies de dégradation ou de division cellulaire. L'approche en SU-Y2H consiste à reformer la protéine ubiquitine divisée en deux segments suite à l'interaction des protéines candidates utilisées en tant qu'appât ou en tant que proie. La libération d'un facteur de transcription s'en suit permettant la croissance de la levure dans un milieu sélectif. L'appât est la construction qui va porter le facteur de transcription en plus de la partie C-terminale de la protéine ubiquitine (Cub). Afin que le facteur de transcription ne se déporte pas systématiquement dans le noyau induisant un faux positif, la protéine appât doit être transmembranaire. Les protéines proies quand elles vont porter le peptide N-terminal de l'ubiquitine (Nub). Le peptide Nub des constructions proies porte la modification I13G afin de supprimer l'interaction directe des peptides Nub et Cub [23].

Les protéines 6K1 et 6K2 des Potyvirus portent un segment transmembranaire [24,25]. Ces deux protéines peuvent théoriquement être utilisées comme appâts. Certaines protéines de l'ESCRT sont capables de se lier à des signaux présents sur la membrane. Cependant, aucune des protéines de l'ESCRT n'est transmembranaire [26,27]. Les constructions proies portent le peptide Nub et peuvent être transmembranaires ou solubles. Nous pouvons ainsi utiliser les protéines de l'ESCRT dans les constructions proies. Les gènes codant pour les protéines 6K1 et 6K2 du WMV ont été transformés dans les constructions appâts pBT3-N, pBT3-SUC et pBT3-STE (Figure 29). Les plasmides pBT3-N et pBT3-SUC permettent l'expression du peptide Cub et du facteur de transcription en position N-terminale et C-terminale respectivement de la protéine appât. Le plasmide pBT3-STE permet l'expression du fragment Cub et du facteur de transcription en position C-terminale de la protéine appât. De plus, le plasmide ne comprend pas de signal d'adressage à la membrane, de manière à être adapté à certaines protéines dont

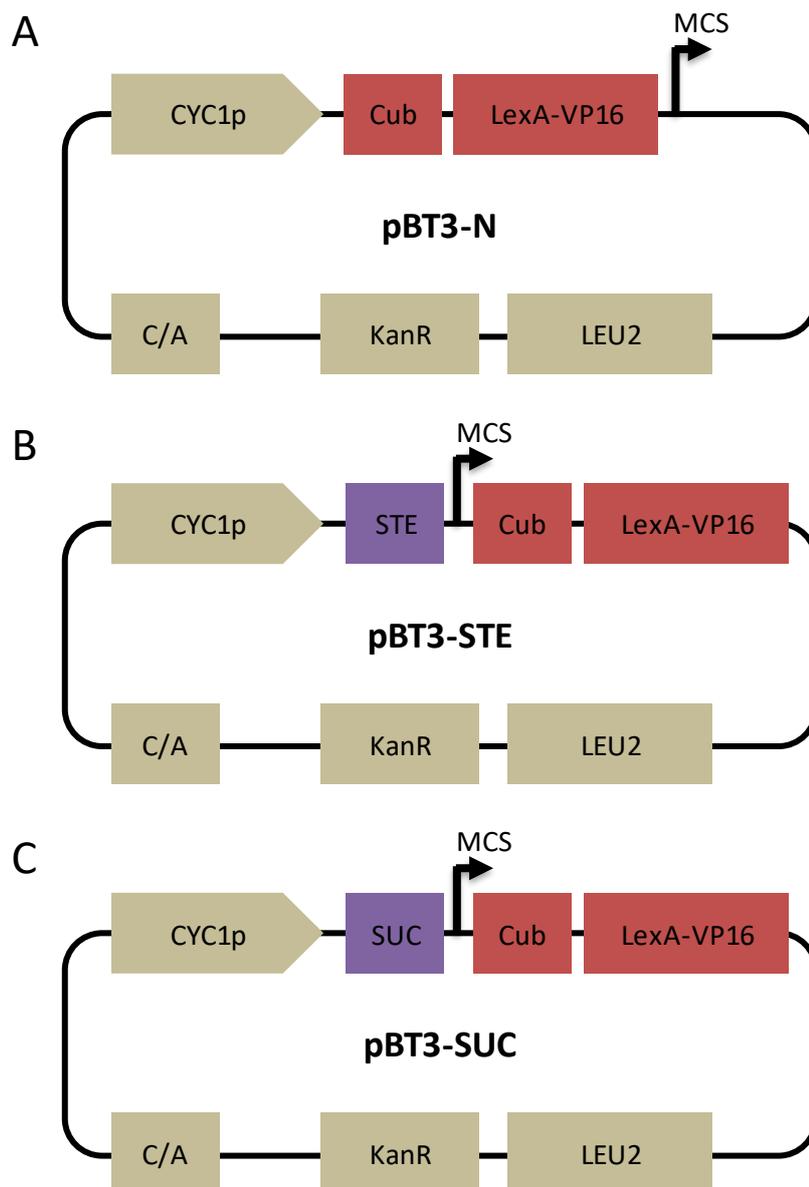


Figure 29 : Représentation des constructions appâts adaptées au double hybride dans la levure en split-ubiquitine (SU-Y2H).

(A) Plasmide pBT3-N pour l'expression cytosolique de la partie N-terminale de la protéine appât. (B) pBT3-STE pour l'expression cytosolique de la partie C-terminale de la protéine appât. (C) pBT3-SUC pour l'expression cytosolique de la partie C-terminale de la protéine appât avec ajout d'un signal de localisation à la membrane clivable. CYC1p : promoteur CYC1 permettant l'expression des protéines appâts dans la levure. SUC : Séquence signal d'adressage à la membrane dérivée d'une protéine de la levure. Cub : Peptide C-terminal de l'ubiquitine. Nub : Peptide N-terminal de l'ubiquitine. LexA-VP16 : cassette du facteur de transcription composé de la protéine LexA issue d'*E. coli* et de la protéine trans-activateur VP16 issue du virus de l'*Herpes simplex*. C/A : Site d'initiation de la réplication dans la levure. KanR : Cassette de résistance à l'antibiotique Kanamycine pour la sélection dans *E. coli*. LEU2 : Cassette auxotrophique de sélection dans la levure. STE : Peptide signal N-terminal de la protéine STE2 issue de *S. cerevisiae*. MCS : Site de clonage multiple.

Le peptide signal fait également partie intégrante de la structure de la protéine.

Afin de déterminer si les constructions n'induisent pas de faux négatifs, nous avons réalisé des tests d'interaction suite à la co-transformation des constructions appâts pBT3-N-6K1, pBT3-STE-6K1, pBT3-SUC-6K1, pBT3-N-6K2, pBT3-STE-6K2, pBT3-SUC-6K2 et la construction appât contrôle pBT3-N-6K2^{TuMV} avec la construction proie Nubl (figure 30) [12]. La construction Nubl exprime le peptide Nub avec l'acide aminé isoleucine à la position 36, lui permettant d'interagir directement avec le peptide Cub exprimé avec l'appât. Elle permet de contrôler l'expression du peptide Cub dans le cytosol de la levure et non dans le milieu extra-cellulaire. Nous avons pu observer la croissance des levures dans les trois conditions de stringence pour toutes les co-transformations avec la construction proie Nubl. La croissance des levures dans le milieu de sélection témoigne de la présence du peptide Cub exprimé avec la protéine appât 6K1 ou 6K2 dans le cytosol pour toutes les constructions.

Afin de contrôler l'ancrage des protéines 6K1 et 6K2 dans la membrane de la levure et d'éviter les faux positifs, nous avons co-transformé les 6 plasmides appâts avec la construction NubG. Exprimé par la construction NubG, le peptide Nub portant la mutation I36G et sans protéine proie, ne peut pas interagir directement avec le peptide Cub.

Les constructions appâts portant pBT3-N-6K1, pBT3-STE-6K1, pBT3-SUC-6K1, pBT3-STE-6K2, pBT3-SUC-6K2 co-transformées avec la construction proie NubG montrent une forte croissance des levures. Cette croissance témoigne de l'expression des protéines appâts de manière soluble et induisant l'activation des gènes rapporteurs malgré l'absence de protéine proie (faux positifs).

Seule la construction pBT3-N-6K2 montre une faible croissance dans les conditions de culture 2 et 3 avec NubG (plus faible croissance qu'avec Nubl). Ces observations associées à la co-transformation de pBT3-N-6K2 avec Nubl et NubG sont similaires à celles observées avec le contrôle pBT3-N-6K2^{TuMV}. Pris ensemble, ces résultats montrent que seule la construction pBT3-N-6K2 est fonctionnelle pour réaliser un crible d'interaction.

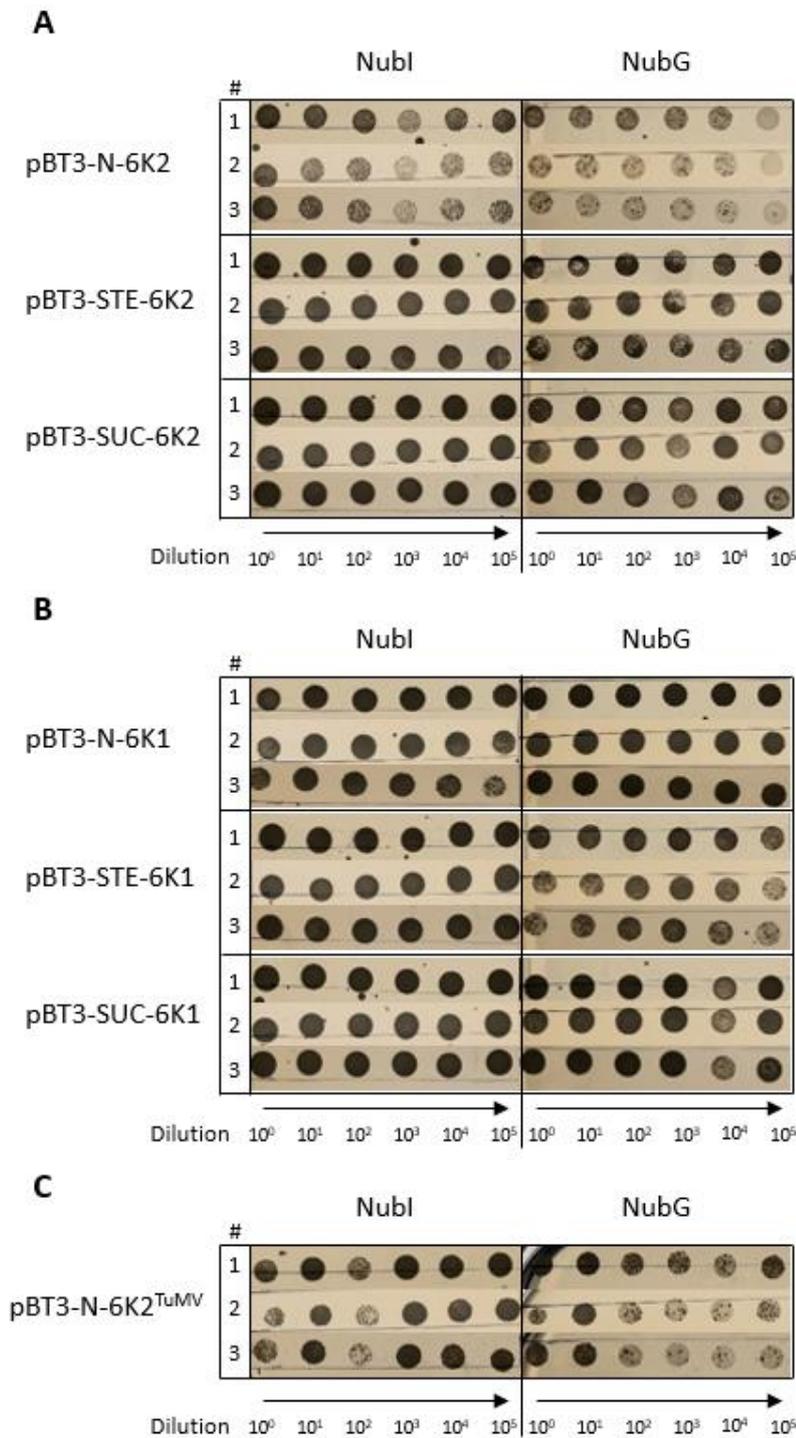


Figure 30 : Validation des constructions appâts.

(A) Co-transformation des plasmides proies portant le gène codant pour 6K2 du WMV avec les constructions proies Nubl et NubG. (B) Co-transformation des plasmides proies portant le gène codant pour 6K1 du WMV avec les constructions proies Nubl et NubG. (C) Co-transformation de la construction proie pBT3-N-6K2^{TuMV} portant le gène codant pour 6K2 du TuMV avec les constructions proies Nubl et NubG. Dilution : niveau de dilution en cascade par palier de 1/10^e. Nubl : plasmide proie exprimant le peptide N-terminal de l'ubiquitine. NubG : plasmide proie exprimant le peptide N-terminal I13G de l'ubiquitine. #1 : condition de culture à 1 μm 3-AT. #2 : condition de culture à 5 μm 3-AT. #3 : condition de culture à 10 μm 3-AT.

Sélection des gènes de l'ESCRT

Les gènes de l'ESCRT ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* par homologie avec les gènes codant pour les protéines de l'ESCRT caractérisés chez les mammifères [28,29]. Afin d'établir une liste de gènes candidats issus de l'ESCRT du melon, nous avons recherché les homologues des gènes de l'ESCRT d'*A. thaliana* dans le génome du melon DHL92 (Table 3). Nous avons ainsi identifié 13 gènes codant pour une protéine appartenant au complexe ESCRT chez le melon : *CmVps23*, *CmVps37*, *CmVps28*, *CmVps36*, *CmVPSps22*, *CmVps25*, *CmVps20.2*, *CmSnf7.1*, *CmSnf7.2*, *CmVps2.1*, *CmVps2.2*, *CmVps2.3*, *CmVps24* et *CmVps4*. Chez *A. thaliana* et le melon, les gènes de l'ESCRT sont répartis sur l'ensemble du génome et ne sont pas associés à un même locus. Nous avons identifié chez le melon l'absence de certains homologues, pouvant être due à une divergence évolutive mais également au séquençage incomplet du génome du melon [30,31]. On remarque la présence de deux homologues de la protéine SNF7 chez le melon contrairement à *A. thaliana* dont le génome n'en porte qu'un seul. Les gènes *Cmlst1-L1*, *Cmlst1-L2*, *Cmlst1-L3*, *CmVps46.1* et *CmVps46.2*, codent pour des régulateurs de l'activité de VPS4 et ont été inclus dans la liste de candidats [32]. Ces co-facteurs sont essentiels à la fermeture des vésicules médiée par l'activité ATPase de VPS4. D'autres co-facteurs tels que VPS60 ou LIP5 n'ont pas été inclus car non-essentiels à la fonction de l'ESCRT [33,34].

<i>Arabidopsis thaliana</i>			<i>Cucumis melo</i>		
Protein name	Gene ID	Chr.	Protein name	Gene ID	Chr.
VPS23A	AT3G12400	3	CmVPS23	MELO3C011795	10
VPS23B	AT5G13860	5		NH*	
VPS37.1	AT3G53120	3		NH*	
VPS37.2	AT2G36680	2	CmVPS37	MELO3C009407	4
VPS28.1	AT4G21560	4	CmVPS28	MELO3C007312	8
VPS28.2	AT4G05000	4		NH*	
VPS36	AT5G04920	5	CmVPS36	MELO3C011385	3
VPS22	AT4G27040	4	CmVPS22	MELO3C025389	6
VPS25	AT4G19003	4	CmVPS25	MELO3C013816	6
VPS20.1	AT5G63880	5		NH*	
VPS20.2	AT5G09260	5	CmVPS20.2	MELO3C008970	8
SNF7	AT4G29160	1	CmSNF7.1, CmVPS32.1	MELO3C004611	5
	NH*		CmSNF7.2, CmVPS32.2	MELO3C015433	2
VPS2.1	AT2G06530	2	CmVPS2.1	MELO3C015505	2
VPS2.2	AT5G44560	5	CmVPS2.2	MELO3C007038	8
VPS2.3	AT1G03950	1	CmVPS2.3	MELO3C012728	1
VPS24.1	AT5G22950	5	CmVPS24	MELO3C004945	12
VPS24.2	AT3G45000	3		NH*	
SKD1, VPS4, AtVPS4	AT2G27600	2	CmSKD1, CmVPS4	MELO3C021413	11
IST1-L1, ISTL1	AT1G34220	1	CmIST1-L1	MELO3C026153	3
IST1-L2, ISTL2	AT1G25420	1	CmIST1-L2	MELO3C003018	9
IST1-L3, ISTL3	AT4G35730	4	CmIST1-L3	MELO3C007956	8
VPS46.1	AT1G17730	1	CmVPS46.1	MELO3C024407	1
VPS46.2	AT1G73030	1	CmVPS46.2	MELO3C013034	4

Table 3 : Gènes homologues de l'ESCRT chez *Arabidopsis thaliana* et le melon.

Gene ID d'*Arabidopsis thaliana* issus de la base de données TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>). Gene ID du melon (*Cucumis melo*) issus de la base de données CuGenDB (<http://cucurbitgenomics.org/>). Chr. : numéro du chromosome ; NH* : no homologous gene.

Les gènes identifiés chez le melon ont été extraits de la séquence du génome de l'accèsion Charentais Monoïque. Les gènes codant pour les protéines de l'ESCRT-I CmVPS37.2, CmVPS23.1, CmVPS28, de l'ESCRT-II CmVPS25, CmVPS36, de l'ESCRT CmSNF7.1, CmSNF7.2, CmVPS2.1, CmVPS2.2, CmVPS2.3, CmVPS24 et le gène codant pour la protéine VPS4 ont été transformés dans la construction proie pPT3-N. Les co-facteurs CmVPS46.1, CmIST1-L2 et CmIST1-L3, impliqués dans le recrutement de la protéine CmVPS4 par une interaction directe ont également été transformés dans la construction pPT3-N. Les gènes codant pour CmVPS23.2, CmVPS22, CmVPS20 et les co-facteurs CmVPS46.2 et IST1-L1 n'ont pas été transformés dans le plasmide pPT3-N, suite à des difficultés d'extraction et d'amplification.

Interaction de 6K2 du WMV avec les protéines de l'ESCRT

Nous avons réalisé un crible d'interaction entre la protéine virale 6K2 du WMV et les protéines de l'ESCRT du melon (table 4). La co-transformation du plasmide appât pBT3-N-6K2 avec les plasmides proies de l'ESCRT a montré une croissance forte des levures pour les protéines CmVPS28, CmVPS24, CmVPS2.1, et CmVPS4 du melon. Cette croissance est de même niveau que celle observée lors de la co-transformation contrôle de la protéine 6K2 avec la protéine HVA22 (contrôle interne).

Les tests d'interactions présentant une croissance faible ne sont pas significatifs et ne permettent pas de considérer une interaction. Ainsi, les protéines codées par les gènes candidats *CmVPS46.1*, *CmVPS37*, *CmVPS25*, *CmVPS36*, *CmSNF7.1*, *CmSNF7.2*, *CmVPS2.2*, *CmVPS2.3*, *CmIST1-L2* et *CmIST1-L3* ne semblent pas interagir avec la protéine virale 6K2 du WMV.

Les protéines homologues CmVPS2.2 et CmVPS2.3 n'interagissent pas avec la protéine 6K2 contrairement à l'homologue CmVPS2.1. Les protéines codées par les trois gènes *CmVPS2* diffèrent fortement et présentent jusqu'à seulement 41.7% d'identité et 61.9% de similarité entre elles (table S7). Ces résultats préliminaires montrent une interaction potentielle de la 6K2 du WMV avec une protéine de l'ESCRT-I, intervenant au niveau de l'assemblage de l'ESCRT : CmVPS28. Ils montrent également une interaction potentielle avec des éléments tardifs de la formation de vésicules internes que sont les protéines de l'ESCRT-III : CmVPS24 et CmVPS2.1 et du complexe VPS4 : CmVPS4 [26,35].

Prey protein	ESCRT complex	6K2 ^{WMV} interaction
HVA22	-	+++
CmVPS23	I	-
CmVPS37		+
CmVPS28		+++
CmVPS25	II	+
CmVPS36		+
CmSNF7.1	III	-
CmSNF7.2		-
CmVPS2.1		+++
CmVPS2.2		+
CmVPS2.3		+
CmVPS24		+++
CmVPS4	Vps4 complex	+++
CmIST1-L2	ESCRT co-factors	+
CmIST1-L3		-
CmVPS46.1		+

Table 4 : Crible d'interactions entre la protéine 6K2 du WMV et les protéines de l'ESCRT du melon. Liste des protéines proies co-transformées avec le plasmide appât pBT3-N-6K2. La croissance des levures est représentée sur une échelle à 3 niveaux : (-) absence de croissance ; (+) croissance faible ; (+++) croissance forte. L'échelle a été établie en comparaison du contrôle de la co-transformation de 6K2 du WMV avec la protéine HVA22.

Validation de l'interaction entre les protéines CmVPS4 et 6K2 du WMV

Afin de confirmer ces interactions, il est nécessaire de les observer à l'aide d'une seconde approche. Pour cela, nous avons réalisé une approche en BiFC sur le système orthologue AtVPS4 et 6K2^{TuMV}. L'approche en BiFC permet de mettre en évidence *in planta* l'interaction de deux protéines fusionnées respectivement avec le peptide N-terminal de la protéine fluorescente YFP (nY) ou avec le peptide C-terminal de la YFP (cY).

Pour s'assurer de l'absence de signal faux positif dans le système, la construction cY-AtVPS4 a été co-exprimée avec la construction nY-AtDIR (contrôle interne), dont la protéine s'exprime dans le milieu extra-cellulaire, ne permettant pas l'interaction avec VPS4 (figure 31). La faible fluorescence observée à 520nm montre le niveau de signal faux positif. L'analyse du spectre d'émission révèle de nombreux signaux non spécifiques témoignant qu'il s'agit d'artefacts.

La co-expression des constructions nY-6K2^{TuMV} et cY-AtVPS4 révèle la présence d'un signal YFP dans la cellule de plante (Figure 32). Indiqué par les flèches, le signal semble être localisé à proximité des chloroplastes en agglomérat de 0.5 à 1µm. Une analyse de spectre sur chaque agglomérat a permis de confirmer l'émission de fluorescence à 530nm, correspondant à l'interaction de la n-YFP et c-YFP. Ces résultats pris ensemble montrent l'interaction des protéines AtVPS4 et 6K2 du TuMV dans la plante.

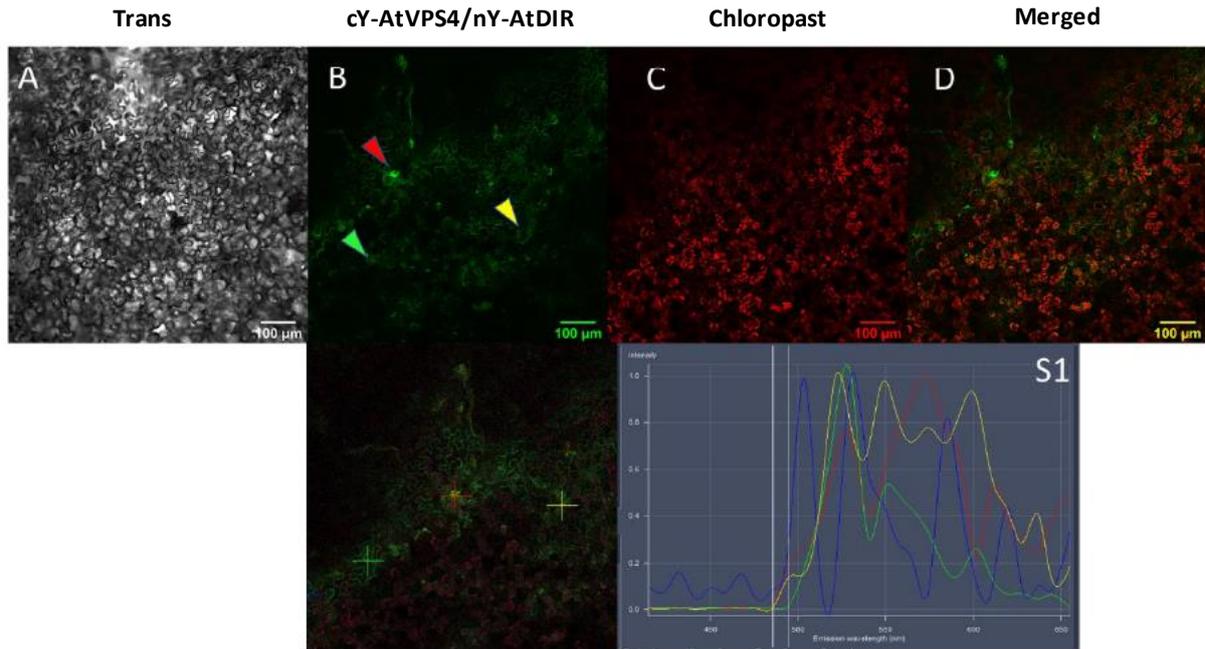


Figure 31 : Contrôle négatif du système BiFC.

La protéine AtDIR fusionnée au peptide N-terminal de la YFP (nY-AtDIR) a été utilisée comme contrôle négatif pour l'interaction avec la protéine AtVPS4 fusionnée au peptide C-terminal de la YFP. L'imagerie confocale a été réalisée 72 h après l'agro-infiltration de *Nicotiana benthamiana* (hpi). Les pointes de flèche indiquent les agrégats sélectionnés dans le panneau B pour effectuer l'analyse spectrale du panel S1. (A) «Trans» : image obtenue en lumière directe ; (B) reconstitution de la fluorescence YFP ; (C) «Chloroplaste» : fluorescence émise par la chlorophylle ; (D) « Merged » : superposition d'images acquises dans les panneaux B et C. Barres d'échelle de taille : 100 μm .

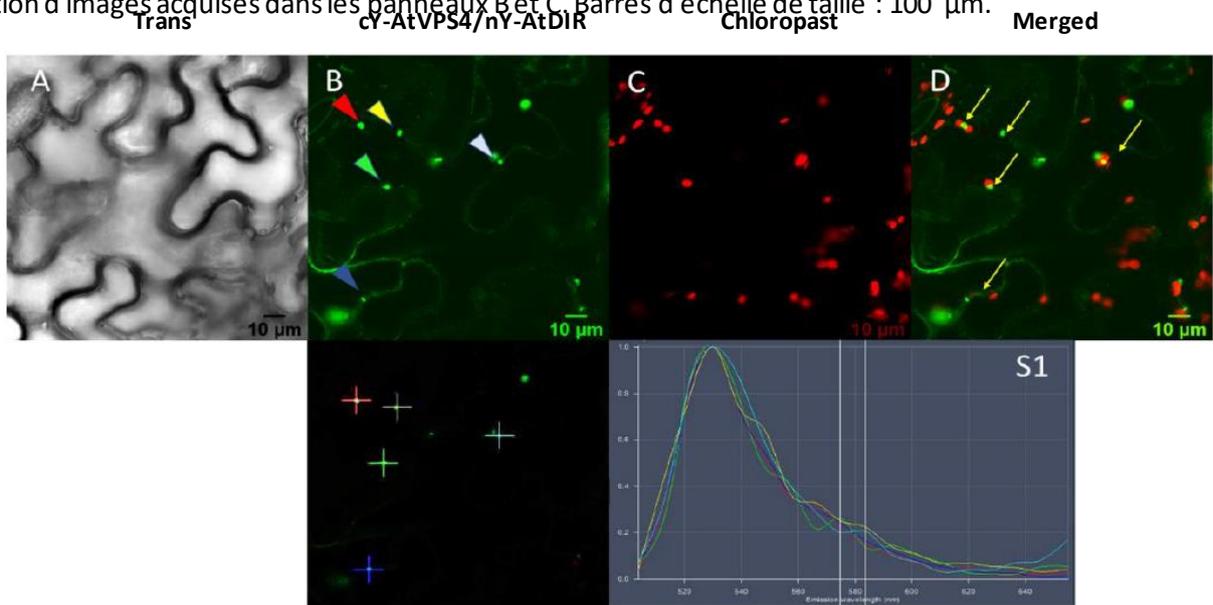


Figure 32 : Evaluation du niveau d'émission de la protéine YFP.

L'imagerie confocale a été réalisée 72 h après l'agro-infiltration de *Nicotiana benthamiana* (hpi). Les protéines 6K2^{TuMV} et AtVPS4 ont été fusionnées aux fragments N-terminal (nY-6K2) et C-terminal (cY-AtVPS4) de la protéine fluorescente YFP respectivement. (A) «Trans» : image obtenue en lumière directe ; (B) reconstitution d'un signal de fluorescence YFP ; (C) «Chloroplaste» : fluorescence émise par la chlorophylle ; (D) « Merged » : superposition d'images acquises dans les panels B et C. Les flèches indiquent les agrégats d'émission de la YFP observés et associés aux chloroplastes. Les pointes de flèche indiquent quels points ont été choisis dans les panneaux B et F pour effectuer l'analyse spectrale montrée en S1 et S2. Les pics à 530 nm sont typiques du signal d'émission maximum YFP confirmant que le YFP observé en B et F est un signal réel en raison de l'interaction entre AtVPS4 et TuMV-6K2. Barre d'échelle de taille : 10 μm .

La protéine 6K2-mCherryFP permet de localiser les VRC du TuMV lors de l'infection d'une cellule de plante [36,37]. Afin de déterminer la localisation de l'interaction AtVPS4 et 6K2TuMV, l'approche BiFC a été réalisée sur des cellules infectées par le TuMV dont la protéine 6K2 est fusionnée à la protéine fluorescente mCherryFP (figure 33). Le signal de la YFP reconstitué par l'interaction 6K2/VPS4 co-localise avec la 6K2-mCherryFP indiquée par les flèches jaunes.

La co-expression dans une plante non-infectée des protéines cY-AtVPS4, nY-6K2 et la protéine fluorescente RFP, permet de contrôler l'absence d'interaction entre les différentes protéines fluorescentes dans la cellule. Nous observons à nouveau l'émission de fluorescence de la YFP suite à l'interaction de VPS4/6K2 de manière localisée. La protéine RFP montre une expression dans le cytosol et le noyau comme attendu. On constate ainsi l'absence d'interaction entre les deux protéines fluorescentes. Ces résultats pris ensemble révèlent l'interaction 6K2/VPS4 au niveau des VRC du TuMV.

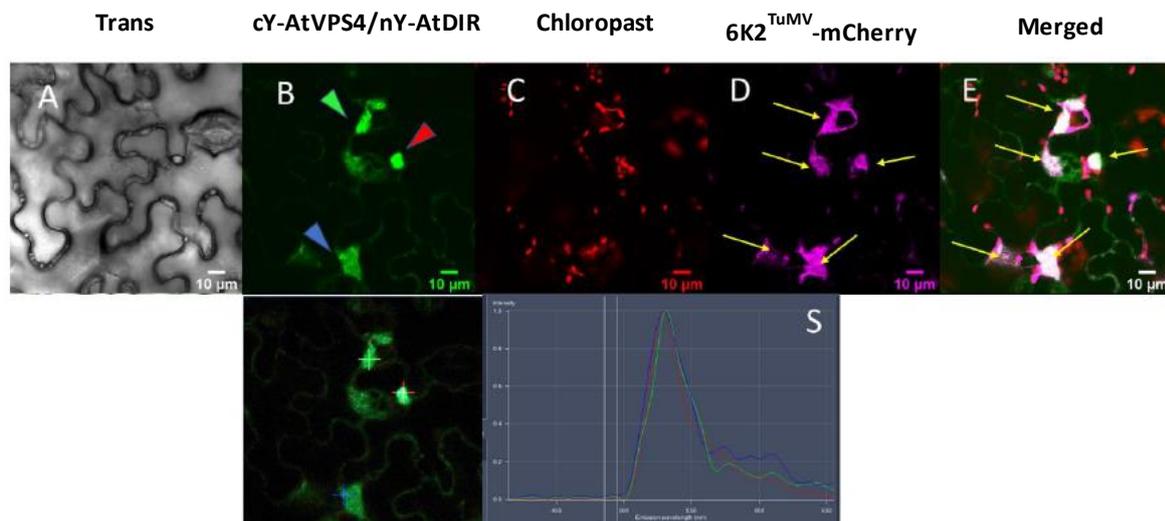


Figure 33 : Localisation de l'interaction VPS4/6K2 dans la cellule de plante.

Les protéines cY-AtVPS4 et nY-6K2^{TuMV} ont été co-exprimées en utilisant l'agro-infiltration dans une plante infectée par la construction virale TuMV-6K2mcherry. L'imagerie confocale a été réalisée 72 h après inoculation (hpi). (A) « Trans » : image obtenue en lumière directe. (B) fluorescence YFP. (C) « Chloroplaste » : fluorescence émise par la chlorophylle. (D) fluorescence mcherryFP émise par la protéine de fusion 6K2-mcherry exprimée lors de l'infection du TuMV-6K2mcherry. (E) « Merged » : superposition d'images acquises dans les panneaux B, C et D. Les flèches dans les panels D et E indiquent les VRC (complexes de réplication virale). Les points de flèches en B indiquent les agglomérats choisis pour l'analyse spectrale montrée dans le panel S. Barre d'échelle de taille : 10 μ m.

Discussion

Les Potyvirus utilisent les membranes de différents compartiments cellulaires pour se répliquer en formant des pseudo-organites et des vésicules dans la plante [10,38–40]. Il a été observé des vésicules virales du TuMV à l'intérieur du ER et des MVBs [9,12,41]. Des interactions directes ont été mises en évidence entre les protéines de l'ESCRT et les particules virales du BMV (*Bromovirus*) et du TBSV (*Tombusvirus*) [3,5,18]. Cependant, le rôle des protéines de l'ESCRT n'a encore jamais été montré dans l'interaction avec les Potyvirus.

Dans cette étude réalisée en collaboration avec INRAE-Bordeaux, nous avons réalisé un crible d'interactions entre la protéine virale 6K2 du WMV et les protéines de l'ESCRT du melon. Nous avons mis en évidence les interactions entre la protéine 6K2 et les protéines CmVPS28, CmVPS24, CmVPS2.1 et CmVPS4 (figure 30).

La protéine VPS28 appartient au sous complexe de l'ESCRT-I. Cette protéine est un des premiers éléments recrutés dans les MVBs pour initier la formation de vésicules internes [26]. Chez les plantes, VPS28 n'est pas connue comme impliquée dans la réplication des virus. Au contraire, dans les modèles animaux, VPS28 est impliquée dans la réplication et l'infection de virus, tels que le virus de la grippe, l'hépatite B et le HIV [42–45].

Les protéines VPS2 et VPS24 appartiennent au sous-complexe ESCRT-III. Ces protéines sont les derniers éléments recrutés du sous-complexe avant le recrutement du complexe VPS4 et de la scission de la vésicule avec la membrane du MVB [26]. La délétion de VPS2 ou VPS24 chez la levure affecte la réplication du BMV [3]. La délétion de VPS24 affecte également la réplication du TBSV chez la levure [5]. Chez la plante, VPS2 et VPS24 sont essentielles à la cellule [46,47]. A notre connaissance, c'est la première fois que l'on met en évidence une interaction potentielle entre les protéines VPS2 et VPS24 et une protéine virale chez les plantes. Trois homologues de la protéine VPS2 sont présents dans le génome d'*A. thaliana*. Nous avons identifié ces 3 homologues dans le génome du melon. Cependant, nous avons observé que seul un des homologues, le gène codant pour CmVPS2.1 semble interagir avec la protéine 6k2 du WMV. L'absence d'interaction avec les deux autres homologues peut s'expliquer par les variations entre la séquence protéique codée par les gènes *CmVPS2.2* et *CmVPS2.3* avec celle codée par *CmVPS2.1* (table S7).

La protéine VPS4 est le dernier composant du complexe ESCRT. Cette protéine désassemble le complexe ESCRT permettant la fermeture et la libération de la vésicule dans le MVB [26,29]. Le recrutement de la protéine VPS4 dans la réplication de virus animaux a été mis en évidence à plusieurs reprises chez les virus HIV et HPV [48,49]. Chez les plantes, la protéine VPS4 est impliquée dans la réplication du TBSV par le biais d'une interaction directe avec la protéine virale p33 [5]. Des changements en acides aminés dans la protéine VPS4 sont également impliqués dans la résistance au ZYMV chez le concombre [14]. De plus, la délétion de VPS4 chez la levure impacte la réplication du BMV [3]. L'interaction de VPS4 avec la protéine 6K2 du WMV renforce l'idée de son rôle dans l'interaction plante-Potyvirus.

Les protéines de l'ESCRT sont recrutées en cascade au niveau du MVB suite à la reconnaissance de signaux protéiques [50]. Tous ces composants sont essentiels pour la formation des vésicules internes. Chez les Potyvirus, des vésicules virales contenant les VRC ont été observées dans la lumière du ER et des MVBs [8,9].

L'interaction de la protéine 6K2 du WMV avec la protéine de l'ESCRT-I : CmVPS28 peut être impliquée dans la formation des vésicules virales en recrutant les autres protéines de l'ESCRT en absence de signal cellulaire.

Certains virus à ARNs⁺, tel que le *Tymovirus* TYMV (*Turnip Yellow mosaic virus*) maintiennent des canaux d'ouverture entre le cytosol et la vésicule virale afin de permettre des échanges de protéines ou de molécules [51,52]. Les interactions de la 6K2 du virus avec les protéines CmVPS2, CmVPS24 et CmVPS4 interviennent tardivement dans la voie de formation des vésicules médiées par l'ESCRT. Il est possible qu'elles soient impliquées dans la régulation de la libération des vésicules virales dans la lumière du ER et du MVB [53,54].

Il faut cependant prendre en considération que les protéines de l'ESCRT sont conservées chez les eucaryotes, et donc présentes chez la levure dans laquelle est réalisée l'approche en SU-Y2H [55]. Les protéines VPS2, VPS24 et VPS4 interagissent directement entre elles, ce qui peut induire une interaction indirecte avec la protéine appât 6K2. Cette problématique a été observée chez le TBSV dont la protéine virale transmembranaire p33 interagit avec la protéine VPS4, VPS23 et le co-facteur BRO1, générant un important niveau de faux positif dans la croissance des levures lors des approches d'interaction [56,57].

Pour le cas du crible impliquant la protéine 6K1, la croissance des levures que nous avons observée suite à la co-transformation des plasmides appât pBT3-N-6K1, pBT3-STE-6K1 et pBT3-SUC-6K1 avec le plasmide proie NubG montre l'auto-activation du facteur de transcription, que celui-ci soit localisé en N-terminal ou en C-terminal de la protéine 6K1 du WMV. Une autre étude suggère que l'expression ectopique de 6K1 résulte en une localisation cytosolique et nucléaire de la protéine de manière soluble [12]. Il semble que nous ayons observé ici un résultat semblable, malgré la présence du domaine hydrophobe et d'un peptide signal sur le plasmide pBT3-SUC. Bien qu'essentiel à la capacité infectieuse des Potyvirus, le rôle de la protéine 6K1 reste à ce jour incompris et aucune interaction avec des facteurs de l'hôte n'a été mise en évidence [58].

Pour déterminer si les protéines VPS28, VPS2, VPS24 et VPS4 jouent un rôle dans la formation des vésicules virales des Potyvirus, il serait intéressant d'observer leur formation dans des conditions d'inhibition de l'activité de chacune de ces protéines indépendamment. L'expression de la protéine 6K2 est suffisante pour induire la formation de vésicules dans la cellule de plante [39]. Cette propriété pourrait être utilisée pour déterminer la capacité de 6K2 à former des vésicules en co-expression d'une protéine dominant-négatif de VPS28, VPS2, VPS24 ou VPS4 [18,46,59].

Il est cependant nécessaire de confirmer ces interactions par une seconde approche. Pour cela, nous avons réalisé un test d'interaction en BiFC dans le système orthologue 6K2^{TuMV} et AtVPS4. Cette approche nous a permis d'identifier l'interaction de la protéine 6K2 du TuMV avec la protéine AtVPS4 *in planta* (figure 31 et 32). De plus, nous avons pu localiser l'interaction de ces protéines au niveau des vésicules virales et du VRC (figure 33).

La présence de la protéine VPS4 au niveau des VRC concorde avec la fonction de déformation des membranes et renforce l'hypothèse de l'implication de l'ESCRT dans la formation des vésicules virales chez les virus à ARNs^{b+} [5]. Cependant, l'ESCRT n'a été décrit qu'au niveau des MVBs [60]. La présence de la protéine VPS4 au niveau des vésicules virales localisées au ER et aux chloroplastes impliquerait le détournement de l'ensemble du complexe.

La confirmation et la localisation des interactions entre les protéines VPS28, VPS2 et VPS24 et la protéine virale 6K2 sont les prochaines étapes dans la description du rôle de l'ESCRT dans la réplication des Potyvirus.

Références :

- [1] den Boon JA, Ahlquist P. Organelle-Like Membrane Compartmentalization of Positive-Strand RNA Virus Replication Factories. *Annu Rev Microbiol* 2010;64:241–56. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134012>.
- [2] Laliberté J-F, Zheng H. Viral Manipulation of Plant Host Membranes. *Annu Rev Virol* 2014;1:237–59. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085532>.
- [3] Diaz A, Zhang J, Ollwerther A, Wang X, Ahlquist P. Host ESCRT proteins are required for bromovirus RNA replication compartment assembly and function. *PLoS Pathog* 2015;11:e1004742. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004742>.
- [4] Diaz A, Ahlquist P. Role of host reticulon proteins in rearranging membranes for positive-strand RNA virus replication. *Curr Opin Microbiol* 2012;15:519–24. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.007>.
- [5] Barajas D, Martín IF de C, Pogany J, Risco C, Nagy PD. Noncanonical Role for the Host Vps4 AAA+ ATPase ESCRT Protein in the Formation of Tomato Bushy Stunt Virus Replicase. *PLoS Pathog* 2014;10:24–32. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004087>.
- [6] Kovalev N, Inaba JI, Li Z, Nagy PD. The role of co-opted ESCRT proteins and lipid factors in protection of tombusviral double-stranded RNA replication intermediate against reconstituted RNAi in yeast. *PLoS Pathog* 2017;13:1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006520>.
- [7] Mullen RT, McCartney AW, Flynn CR, Smith GST. Peroxisome biogenesis and the formation of multivesicular peroxisomes during tombusvirus infection: A role for ESCRT? *Can J Bot* 2006;84:551–64. <https://doi.org/10.1139/B06-005>.
- [8] Wei T, Huang T-S, McNeil J, Laliberte J-F, Hong J, Nelson RS, et al. Sequential Recruitment of the Endoplasmic Reticulum and Chloroplasts for Plant Potyvirus Replication. *J Virol* 2010;84:799–809. <https://doi.org/10.1128/JVI.01824-09>.
- [9] Movahed N, Cabanillas DG, Wan J, Vali H, Laliberté JF, Zheng H. Turnip mosaic virus components are released into the extracellular space by vesicles in infected leaves. *Plant Physiol* 2019;180:1375–88. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00381>.
- [10] Movahed N, Patarroyo C, Sun J, Vali H, Laliberte J-F, Zheng H. Cytoplasmic Inclusion Protein of Turnip Mosaic Virus serves as a docking point for the intercellular movement of viral replication vesicles. *Plant Physiol* 2017;175:pp.01484.2017. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01484>.
- [11] Grangeon R, Agbeci M, Chen J, Grondin G, Zheng H, Laliberte J-F. Impact on the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus of Turnip Mosaic Virus Infection. *J Virol* 2012;86:9255–65. <https://doi.org/10.1128/jvi.01146-12>.
- [12] Jiang J, Patarroyo C, Garcia Cabanillas D, Zheng H, Laliberté J-F. The Vesicle-Forming 6K 2 Protein of Turnip Mosaic Virus Interacts with the COPII Coatomer Sec24a for Viral Systemic Infection. *J Virol* 2015;89:6695–710. <https://doi.org/10.1128/JVI.00503-15>.
- [13] Garcia CD, Jiang J, Movahed N, Germain H, Yasuyuki Yamaji HZ, Laliberté J-F. Turnip mosaic virus uses the snare protein vti11 in an unconventional route for replication vesicle trafficking. *Plant Cell* 2018;30:2594–615. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00281>.
- [14] Amano M, Mochizuki A, Kawagoe Y, Iwahori K, Niwa K, Svoboda J, et al. High-resolution mapping of zym, a recessive gene for Zucchini yellow mosaic virus

- resistance in cucumber. *Theor Appl Genet* 2013;126:2983–93. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2187-5>.
- [15] Martínez F, Rodrigo G, Aragonés V, Ruiz M, Lodewijk I, Fernández U, et al. Interaction network of tobacco etch potyvirus NIa protein with the host proteome during infection. *BMC Genomics* 2016;17:87. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2394-y>.
- [16] Brückner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int J Mol Sci* 2009;10:2763–88. <https://doi.org/10.3390/ijms10062763>.
- [17] Sasvari Z, Kovalev N, Gonzalez PA, Xu K, Nagy PD. Assembly-hub function of ER-localized SNARE proteins in biogenesis of tombusvirus replication compartment. vol. 14. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007028>.
- [18] Barajas D, Jiang Y, Nagy PD. A unique role for the host ESCRT proteins in replication of Tomato bushy stunt virus. *PLoS Pathog* 2009;5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000705>.
- [19] Chang AY, Chau VW, Landas JA, Pang Y. Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI Methods* 2017;1:22–5.
- [20] Wise AA, Liu Z, Binns AN. Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. *Methods Mol Biol* 2006;343:43–53. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:43>.
- [21] Zhang Y, Chen M, Siemiatkowska B, Toleco MR, Jing Y, Strotmann V, et al. A Highly Efficient *Agrobacterium*-Mediated Method for Transient Gene Expression and Functional Studies in Multiple Plant Species. *Plant Commun* 2020;1:100028. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100028>.
- [22] Waadt R, Kudla J. In plant visualization of protein interactions using bimolecular fluorescence complementation (BiFC). *Cold Spring Harb Protoc* 2008;3. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4995>.
- [23] Lentze N, Auerbach D. Membrane-based yeast two-hybrid system to detect protein interactions. *Curr Protoc Protein Sci* 2008:1–28. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1917s52>.
- [24] Waltermann A, Maiss E. Detection of 6K1 as a mature protein of 6 kDa in plum pox virus-infected *Nicotiana benthamiana*. *J Gen Virol* 2006;87:2381–6. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81873-0>.
- [25] Revers F, García JA. *Molecular biology of potyviruses*. vol. 92. 1st ed. Elsevier Inc.; 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.006>.
- [26] Piper RC, Katzmann DJ. Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:519–47. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123319>.
- [27] Hurley JH, Hanson PI. Membrane budding and scission by ESCRT machinery 2010;11:556–66. <https://doi.org/10.1038/nrm2937>. Membrane.
- [28] Otegui MS, Spitzer C. Endosomal functions in plants. *Traffic* 2008;9:1589–98. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00787.x>.
- [29] Gao C, Zhuang X, Shen J, Jiang L. Plant ESCRT Complexes: Moving Beyond Endosomal Sorting. *Trends Plant Sci* 2017;22:986–98. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.003>.
- [30] Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, Gonzalez VM, et al. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:11872–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205415109>.

- [31] Zhao G, Lian Q, Zhang Z, Fu Q, He Y, Ma S, et al. A comprehensive genome variation map of melon identifies multiple domestication events and loci influencing agronomic traits. *Nat Genet* 2019;51:1607–15. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0522-8>.
- [32] Lottridge JM, Flannery AR, Vincelli JL, Stevens TH. Vta1p and Vps46p regulate the membrane association and ATPase activity of Vps4p at the yeast multivesicular body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6202–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601712103>.
- [33] Wang F, Shang Y, Fan B, Yu JQ, Chen Z. Arabidopsis LIP5, a Positive Regulator of Multivesicular Body Biogenesis, Is a Critical Target of Pathogen-Responsive MAPK Cascade in Plant Basal Defense. *PLoS Pathog* 2014;10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004243>.
- [34] Sarah M. Rue, Sara Mattei, Suraj Saksena and SDE. Novel Ist1-Did2 Complex Functions at a Late Step in Multivesicular Body Sorting. *Mol Biol Cell* 2007;19:308–17. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07>.
- [35] Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery. *Curr Biol* 2012;22:R116–20. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.028>.
- [36] Grangeon R, Jiang J, Wan J, Agbeci M, Zheng H, Laliberté JF. 6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection. *Front Microbiol* 2013;4:1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00351>.
- [37] Cotton S, Grangeon R, Thivierge K, Mathieu I, Ide C, Wei T, et al. Turnip Mosaic Virus RNA Replication Complex Vesicles Are Mobile, Align with Microfilaments, and Are Each Derived from a Single Viral Genome. *J Virol* 2009;83:10460–71. <https://doi.org/10.1128/JVI.00819-09>.
- [38] Grangeon R, Cotton S, Laliberté J-F. A model for the biogenesis of Turnip mosaic virus replication factories. *Commun Integr Biol* 2010;3:363–5. <https://doi.org/10.4161/cib.3.4.11968>.
- [39] Löhmus A, Varjosalo M, Mäkinen K. Protein composition of 6K2-induced membrane structures formed during Potato virus A infection. *Mol Plant Pathol* 2016;17:943–58. <https://doi.org/10.1111/mpp.12341>.
- [40] Wei T, Wang A. Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *J Virol* 2008;82:12252–64. <https://doi.org/10.1128/JVI.01329-08>.
- [41] Wei T, Zhang C, Hou X, Sanfaçon H, Wang A. The SNARE Protein Syp71 Is Essential for Turnip Mosaic Virus Infection by Mediating Fusion of Virus-Induced Vesicles with Chloroplasts. *PLoS Pathog* 2013;9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003378>.
- [42] Bruce EA, Medcalf L, Crump CM, Noton SL, Stuart AD, Wise HM, et al. Budding of filamentous and non-filamentous influenza A virus occurs via a VPS4 and VPS28-independent pathway. *Virology* 2009;390:268–78. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.05.016>.
- [43] Stieler JT, Prange R. Involvement of ESCRT-II in hepatitis B virus morphogenesis. *PLoS One* 2014;9:15–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091279>.
- [44] Stuchell MD, Garrus JE, Müller B, Stray KM, Ghaffarian S, McKinnon R, et al. The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem* 2004;279:36059–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405226200>.
- [45] Silvestri LS, Ruthel G, Kallstrom G, Warfield KL, Swenson DL, Nelle T, et al. Involvement of vacuolar protein sorting pathway in Ebola virus release independent of TSG101 interaction. *J Infect Dis* 2007;196. <https://doi.org/10.1086/520610>.

- [46] Kovalev N, Martín IF de C, Pogany J, Barajas D, Pathak K, Risco C, et al. The role of viral RNA and co-opted cellular ESCRT-I and ESCRT-III factors in formation of tombusvirus spherules harboring the tombusvirus replicase. *J Virol* 2016;90:JV1.02775-15. <https://doi.org/10.1128/JVI.02775-15>.
- [47] Raymond CK, I H-S, Vater CA, Stevens TH. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* 1992;3:1389–402. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-03-0184>.
- [48] Engelenburg SB Van, Shtengel G, Sengupta P, Waki K, Jarnik M, Ablan SD, et al. Distribution of ESCRT machinery at HIV assembly sites reveals virus scaffolding of ESCRT subunits. *Physiol Behav* 2016;176:139–48. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
- [49] Broniarczyk J, Pim D, Massimi P, Bergant M, Goździcka-Józefiak A, Crump C, et al. The VPS4 component of the ESCRT machinery plays an essential role in HPV infectious entry and capsid disassembly. *Sci Rep* 2017;7:45159. <https://doi.org/10.1038/srep45159>.
- [50] Hurley JH, Emr SD. THE ESCRT COMPLEXES: Structure and Mechanism of a Membrane-Trafficking Network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2006;35:277–98. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.102126>.
- [51] Hatta T, Bullivant S, Matthews R. Fine Structure of Vesicles Induced in Chloroplasts of Chinese Cabbage Leaves by Infection with Turnip Yellow Mosaic Virus 1973.
- [52] Dreher TW. Turnip yellow mosaic virus: Transfer RNA mimicry, chloroplasts and a C-rich genome. *Mol Plant Pathol* 2004;5:367–75. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2004.00236.X>.
- [53] Azmi IF, Davies BA, Xiao J, Babst M, Xu Z, Katzmann DJ. ESCRT-III Family Members Stimulate Vps4 ATPase Activity Directly or via Vta1. *Dev Cell* 2008;14:50–61. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.10.021>.
- [54] Davies BA, Babst M, Katzmann DJ. Regulation of Vps4 during MVB Sorting and Cytokinesis. *Growth (Lakeland)* 2008;23:1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- [55] Winter V, Hauser MT. Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *Trends Plant Sci* 2006;11:115–23. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.01.008>.
- [56] Wemmer M, Azmi I, West M, Davies B, Katzmann D, Odorizzi G. Bro1 binding to Snf7 regulates ESCRT-III membrane scission activity in yeast. *J Cell Biol* 2011;192:295–306. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007018>.
- [57] Luhtala N, Odorizzi G. Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol* 2004;166:717–29. <https://doi.org/10.1083/jcb.200403139>.
- [58] Bosque G, Folch-Fortuny A, Picó J, Ferrer A, Elena SF. Topology analysis and visualization of Potyvirus protein-protein interaction network. *BMC Syst Biol* 2014;8:129. <https://doi.org/10.1186/s12918-014-0129-8>.
- [59] Pathak KB, Sasvari Z, Nagy PD. The host Pex19p plays a role in peroxisomal localization of tombusvirus replication proteins. *Virology* 2008;379:294–305. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.06.044>.
- [60] Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J* 2011;30:3481–500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>.

CHAPITRE IV
Discussion générale

Aperçu

Les virus de plantes impactent fortement le rendement des cultures [1–4]. S'ajoute à cela l'augmentation de la population, estimée à 9 milliards en 2050 par la FAO, les besoins sanitaires de réduction des intrants, et le réchauffement climatique augmentant l'incidence des épidémies (FAO; www.fao.org) [5–9]. Pour protéger et améliorer le rendement des cultures, les variétés portant des résistances génétiques se sont révélées être des outils efficaces [10–12]. Les Potyvirus sont considérés comme la plus grande famille de virus infectant les plantes [13–15]. Ils appartiennent aux virus du groupe IV dont le génome est sous forme d'ARN simple brin positif (ARNsb(+)) [16]. La résistance génétique aux *Potyvirus* la plus couramment utilisée est portée par le gène *elf4e* [17–19]. Les melons appartenant à la famille des Cucurbitaceae sont particulièrement sensible aux Potyvirus et aucun allèle de résistance aux Potyvirus du gène *elf4e* n'a été caractérisé chez cette espèce [17,20,21]. Mon projet de thèse avait pour objectif d'identifier de nouvelles sources de résistance génétique aux Potyvirus chez le melon.

Amano *et al.* (2013) ont montré l'implication de substitutions sur le gène codant pour la protéine VPS4 du concombre dans la résistance au *Potyvirus* ZYMV [22]. Dans la cellule, VPS4 appartient au mécanisme ESCRT, responsable de la formation de vésicules dans les compartiments appelé Corps multivésiculaires (MVBs) [23–25]. Il a été montré il y a quelques années le rôle des protéines de l'ESCRT dans la réplication du *Tombusvirus* TBSV et *Bromovirus* BMV, deux virus appartenant au groupe des virus à ARNsb(+) [26–28]. Chez les *Potyvirus*, les mécanismes de transport des vésicules virale du réticulum endoplasmique (ER) vers les chloroplastes et vers les MVBs impliquent les protéines COPII SEC24A et SNARE VTI11, respectivement [29,30]. Les mécanismes induisant la formation de vésicules virales par les Potyvirus dans le lumen du ER restent incompris.

Dans les travaux que j'ai réalisés, deux aspects en particulier ont été étudiés : (1) Quel rôle joue la protéine VPS4 et les autres protéines de l'ESCRT dans la réplication des *Potyvirus* ? (2) Existe-t-il des résistances chez le melon, équivalentes à celle identifiée sur le gène *Vps4* du concombre pour la résistance au ZYMV ?

Dans le **CHAPITRE III**, j'ai montré l'implication de l'ESCRT dans la réplication des Potyvirus. Pour y parvenir, nous avons recherché des interactions entre les protéines de l'ESCRT du melon et les protéines virales du WMV. Les approches de doubles hybrides réalisées entre les protéines des Potyvirus et les protéines de plantes, présente dans la bibliographie, n'ont pas permis d'identifier des protéines de l'ESCRT comme facteur de sensibilité [31–33]. Ceci peut s'expliquer par les limitations techniques du système double hybride, connue comme non efficace pour la caractérisation des interactions des protéines membranaires. A titre d'exemple le système double hybride standard n'a pas permis d'étudier les interactions des protéines virales 6K1 et 6K2 dû à leur domaine transmembranaire. Le rôle des protéines transmembranaires des Potyvirus dans l'interaction avec de protéines de plantes a été montré pour la protéine 6K2 par une approche de double hybride adaptée aux protéines membranaires (SU-Y2H) [29,30]. Pour les autres familles de virus, il a été montré que les protéines transmembranaire p33 et 2a exprimées par le TBSV et le BMV respectivement, interagissent directement avec des protéines de l'ESCRT [26–28]. Ainsi nous avons concentré notre crible d'interaction sur les protéines 6K1 et 6K2 pour lesquelles les interactions avec les protéines de l'ESCRT n'avaient pas été testées jusqu'à présent. Pour cela, dans un premier temps, nous avons cloné dans des plasmides appâts les protéines virales 6K1 et 6K2 du WMV. Dans un second temps, nous avons identifiées les gènes codant pour des protéines de l'ESCRT chez le melon en utilisant les séquences homologues identifié chez l'organisme modèle *Arabidopsis thaliana*. Les séquences identifiées ont été clonées dans des plasmides proies adaptées au SU-Y2H. Les résultats de ce crible ont révélé une interaction forte de la protéine 6K2 avec les protéines CmVPS28, CmVPS2, CmVPS24 et CmVPS4. Ainsi on distingue une interaction avec la protéine du sous-complexe ESCRT-I : VPS28, impliquée dans l'initiation de l'ESCRT [34]. On retrouve également les interactions avec les 3 dernières protéines recrutées lors de l'assemblage de l'ESCRT : CmVPS2, CmVPS24 et CmVPS4 et la protéine 6K2 du WMV [35]. Pour confirmer et localiser ces interactions *in planta*, une seconde approche utilisant le système orthologue AtVPS4 et 6K2^{TuMV} a été réalisée. Elle a permis de localiser l'interaction de ces deux protéines au niveau des VRC et des chloroplastes.

Dans le **CHAPITRE II**, j'ai démontré qu'une mutation non-synonyme portée par l'allèle codant pour la protéine CmVPS4^{P30R} est responsable de la résistance au *Potyvirus* WMV chez le melon. Pour y parvenir, nous avons séquencé le gène *CmVps4* extrait d'une collection de 652 accessions de melon. Nous avons pu identifier 4 accessions portant l'allèle CmVPS4^{P30R}, dont l'accèsion TGR-1551. Cette accèsion a été étudiée pour plusieurs résistances à différents pathogènes dont la résistance au WMV [36–39]. Par cartographie génétique, il a été démontré que la résistance récessive est portée par une large région, qui comprend le gène *CmVps4* [36,40]. La substitution portée par l'allèle CmVPS4^{P30R} identifié dans TGR-1551 et celles présentes sur la protéine VPS4 du concombre induisant la résistance au ZYMV sont localisées sur le même domaine de la protéine. Bien qu'aucune résistance au ZYMV n'a été identifiée chez ces 4 accessions, toutes sont résistantes au WMV. Une première approche de validation a été mise en place en utilisant une collection de 6000 familles EMS de melon [41]. Le crible de cette collection pour le gène *CmVps4* a révélé l'absence de mutations non-synonymes sur le domaine MIT et de mutations non-sens. Les familles portant des mutations sur les autres domaines de CmVPS4 n'ont montré aucune résistance au WMV et au ZYMV. La seconde approche a été réalisée en transformant le génome du WMV avec le gène *Vps4^{wt}* issu de l'accèsion sensible Charentais Monoïque. Cette approche a permis de restaurer la sensibilité au WMV chez l'accèsion résistante TGR-1551.

L'ESCRT et les vésicules virales

Lors de l'infection d'une plante par le Potyvirus TuMV, des vésicules contenant les VRCs se forment au niveau du réticulum endoplasmique (ER). Ces vésicules sont issues de la formation de vésicules externes par le mécanisme COPII grâce au recrutement de la protéine SEC24A par la protéine virale 6K2 [29,42]. Hors infection, les vésicules formées par COPII sont destinées à fusionner avec l'appareil de Golgi (GA). Au cours de l'infection par le TuMV, ces vésicules sont détournées de leur destination pour se diriger vers les chloroplastes [43]. La mutation du motif GxxxG sur la protéine 6K2 bloque le détournement des vésicules virales qui vont fusionner avec le GA. Dans ces conditions, le virus perd sa capacité infectieuse [30]. Des structures appelées inclusions cytoplasmiques (CI) dans les chloroplastes sont observées suite à l'infection d'une cellule [44]. Elles semblent être issues de la fusion des vésicules virales provenant du ER.

Des inconnues demeurent dans la description des événements conduisant à la formation de ces vésicules. Au niveau de la cellule, la formation des vésicules médiée par le mécanisme COPII permet le transport des protéines issues du lumen du ER et des protéines transmembranaires [45,46]. Cependant, les protéines de l'hôte, les protéines virales et le génome du virus qui composent le VRC sont localisés dans le cytosol [47,48]. Pour que ces éléments soient présents à l'intérieur d'une vésicule et en mouvement dans le cytosol, un événement conduisant à la présence des VRCs dans le lumen du ER doit se produire. Pour définir cet événement, je propose de compléter l'hypothèse de Jean-François Laliberté et Hélène Sanfaçon (2010) [49] avec les résultats obtenus dans cette thèse [49]. Dans le modèle proposé, une première vésicule se forme à l'intérieur du ER qui intègre le VRC. Une seconde invagination se produit médiée par le mécanisme COPII et recrutée par la protéine virale 6K2. Cette seconde vésicule intègre la première vésicule, donnant forme à une vésicule à double membrane (DMV) dans le cytosol. La formation de DMV est connue chez les virus d'animaux tels que les *Coronavirus* et les *Flaviviridae* [50,51]. Chez les virus d'animaux, ces déformations membranaires sont généralement associées aux cycles infectieux en permettant le mouvement de vésicules dans le cytosol [52,53].

Chez les virus de plante, peu d'informations sont disponibles sur la structure lipidique des vésicules. Cependant, il a été récemment montré chez le TuMV, la présence de DMVs au cours de l'infection [54]. La présence de protéines de l'ESCRT au niveau des VRCs des Potyvirus, que nous avons montrée par des interactions avec la protéine 6K2, peut s'expliquer par leur implication dans la formation de la première vésicule virale au niveau du ER.

Dans cette hypothèse représentée sur la figure 34, suite à l'infection de la cellule de plante par un Potyvirus, l'ESCRT serait recrutée au niveau de l'ER par la protéine 6K2 pour former une première vésicule contenant le VRC dans le lumen du ER. Le recrutement de la protéine VPS28 peut permettre d'initier le recrutement des autres facteurs de l'ESCRT en absence des signaux ubiquitine présents sur les membranes des MVBs, nécessaires au recrutement des protéines de l'ESCRT-I [23,24]. Ce détournement de l'ESCRT au niveau du ER a déjà été observé lors de l'infection du BMV [26].

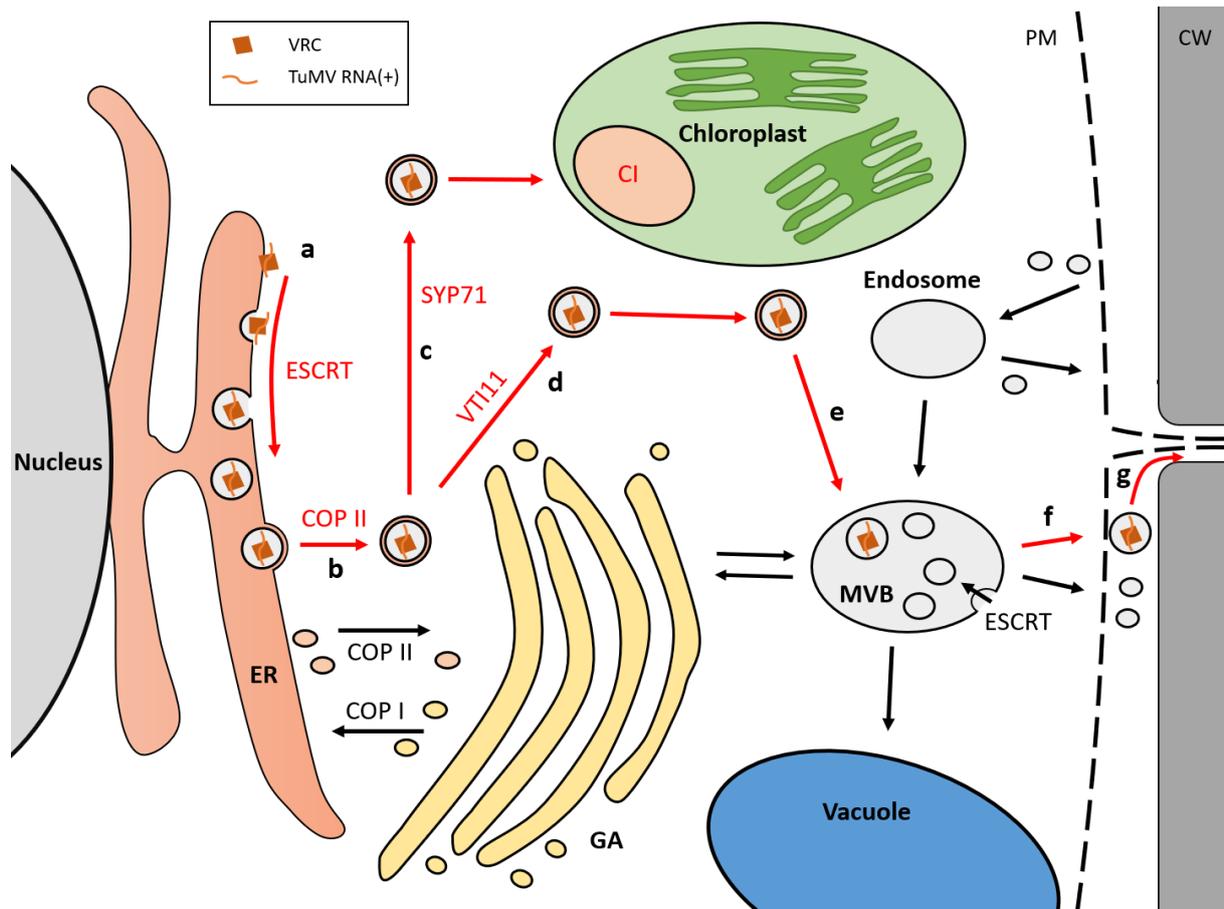


Figure 34 : Modèle du mouvement des vésicules induite lors de l'infection d'une cellule de plante par le TuMV.

(a) Suite à l'infection de la cellule par le TuMV, l'ARN(+) est directement traduit. Les protéines virales exprimées vont former le VRC au niveau de la membrane du ER en recrutant les protéines de l'hôte. Les protéines de l'ESCRT vont induire la formation d'une vésicule dans le lumen du ER contenant le VRC et le génome du virus. (b) La vésicule virale va sortir du ER en formant une seconde vésicule entourant la première à l'aide du mécanisme COP II. Cette vésicule à double membrane (DMV) se retrouve dans le cytoplasme. (c) Une première voie de détournement en direction des chloroplastes implique la protéine SNARE SYP71. Les inclusions cytoplasmiques (CI) sont observées suite à l'infection du TuMV. (d) Une seconde voie de détournement en direction des MVBs implique la protéine SNARE VTI11. (e) Les DMV vont fusionner avec la membrane des MVBs, libérant dans le lumen de ce compartiment une vésicule virale à simple membrane. (f) Les vésicules virales vont être libérées dans l'apoplasme de la cellule suite à la fusion du MVB avec la membrane plasmique. (g) Enfin, la vésicule contenant le VRC et le génome du TuMV vont pouvoir traverser les plasmodesmes pour infecter les cellules adjacentes. ER: Réticulum endoplasmique. GA: Appareil de Golgi. MVB: Corps multivésiculaire. CI: Inclusion cytoplasmique. PM : Membrane plasmique. CW: Paroi cellulaire. ESCRT: Endosomal sorting complex required for transport. COP I/II: Coater protein complex I/II.

Lors de la réplication du TBSV, une invagination se forme au niveau des peroxysomes en maintenant une ouverture entre le cytosol et la vésicule [55]. La protéine VPS4 est le dernier élément impliqué dans la fermeture des vésicules lumineales. Il est possible que l'interaction de la protéine p33 du TBSV avec VPS4 inhibe cette dernière étape pour maintenir cette ouverture. Chez les Potyvirus, il a été montré que les vésicules contenant les VRCs sont spécifiquement structurées avec un seul génome viral avant initiation de la réplication [56]. Ainsi, il est également possible que l'interaction de 6K2 avec les protéines VPS2, VPS24 et VPS4 joue un rôle dans la régulation des vésicules virales au niveau du ER en maintenant une ouverture avec le cytosol jusqu'à l'intégration de toutes les protéines composant le VRC et l'ARNsb(+) viral.

Ensuite, le mécanisme COPII, recruté également par la protéine 6K2, induit la formation de la DMV [49,52]. Enfin cette vésicule est détournée de la voie COPII pour se diriger vers les chloroplastes avec lesquels les vésicules vont fusionner à l'aide de l'interaction indirecte de la protéine SNARE SYP71 et 6K2 [43].

Une autre voie a été décrite impliquant un détournement de la voie COPII par le recrutement de la protéine SNARE VTI11 et adressant ces vésicules aux MVBs [30]. Les vésicules virales identifiées dans les MVBs sont ensuite observées dans l'apoplasme [57,58]. Indépendamment, il a été observé le mouvement de cellule à cellule des vésicules virales formées par le mécanisme COPII recruté par la protéine 6K2 du TuMV [59]. Il a été proposé que ces vésicules aient pour destination les cellules adjacentes afin d'initier un nouveau cycle d'infection sans passer par l'étape d'encapsulation du génome viral.

Dans le modèle de vésicules à doubles membranes, la fusion avec le MVB permettrait de libérer une vésicule à simple membrane dans le lumen du MVB, état nécessaire pour libérer dans une cellule voisine les ARNs issus de la réplication dans les vésicules. La fusion avec la membrane des MVBs ne nécessiterait pas l'implication de l'ESCRT. Il est possible que les interactions observées entre les protéines 6K2 et les protéines VPS2, VPS24 et VPS4 soient impliquées dans l'inhibition de l'ESCRT au niveau des MVBs afin d'inhiber la voie de dégradation des protéines à destination des vacuoles et favoriser la fusion des MVBs à la membrane plasmique [60].

L'ESCRT dans la résistance aux Potyvirus

Jusqu'à présent, l'ESCRT était décrit dans la résistance aux virus uniquement au travers de la résistance au ZYMV induite par une double substitution sur la protéine VPS4 chez le concombre [22]. Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'une substitution sur le même domaine de la protéine VPS4 chez le melon TGR-1551 induit une résistance à la souche WMV-fr du WMV. De plus, cette résistance de TGR-1551 a été observée efficace vis-à-vis de 21 autres souches de WMV d'origines espagnoles [61]. Nous avons pu observer que la résistance au WMV chez TGR-1551 et les autres accessions portant cet allèle est quantitative. La charge virale du WMV mise en évidence lors des tests ELISA est sous le seuil de détection. Cependant, lors des notations, nous avons observé de légers symptômes sur certains tissus, témoignant de la présence du virus chez l'hôte.

Nos observations ne permettent pas de déterminer si la résistance induite par la substitution VPS4^{P30R} est due à un retard de l'infection systémique, permettant à la plante de se développer en présentant peu de symptômes, ou si la résistance est due à un ralentissement du cycle de réplication.

Les vésicules virales et pseudo-compartiments observés au cours de l'infection d'une plante par les virus à ARNs(+), sont essentielles à la réalisation de leur cycle infectieux. Ces vésicules contiennent tous les éléments nécessaires à la réplication du génome en plusieurs dizaines de copies [49,62]. De plus, elles permettent de protéger l'étape de réplication de l'ARN des mécanismes de RNA silencing de la plante [63,64]. Chez le melon TGR-1551, l'augmentation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse immunitaire est observée suite à l'infection avec le WMV [65]. Il est possible que le changement d'acide aminé observé sur la protéine VPS4 de TGR-1551 affecte partiellement la capacité du virus à former ces vésicules. Cela aboutirait à une plus grande exposition de l'ARN viral aux défenses immunitaires de la plante.

Nous avons vu précédemment que le recrutement des protéines VPS2, VPS24 et VPS4 peut jouer un rôle dans la régulation des MVBs et favoriser leur adressage à la membrane plasmique pour libérer les vésicules virales dans l'apoplasme [57]. La substitution P30R sur la protéine VPS4 peut ainsi affecter cette régulation des MVBs et ralentir l'infection de cellule à cellule.

Perspectives

Pour mieux comprendre le rôle de l'ESCRT dans la réplication des Potyvirus, il sera nécessaire de confirmer les interactions de la protéine 6K2 du WMV et des protéines de l'ESCRT CmVPS28, CmVPS2 et CmVPS24 dans le système orthologue *Arabidopsis thaliana*-TuMV. D'autres approches tel que la co-immunoprécipitation (CoIP), peuvent être mise en place pour valider ces interactions [66,67]. Cependant, l'approche de BiFC mise en place dans ce projet permet de coupler la validation de l'interaction avec la localisation cellulaire. Cette approche peut être étendue en marquant la membrane du réticulum endoplasmique, permettant de mettre en évidence s'il y a colocalisation des protéines de l'ESCRT avec cet organite [68]. Les mécanismes de formation des vésicules virales du TuMV localisées dans les MVBs ne sont pas connus. Déterminer si ces vésicules sont issues de la fusion de DMV ou d'invagination permettrait de comprendre le rôle joué par l'ESCRT au niveau des MVB lors d'une infection par un Potyvirus. Pour y parvenir, je propose d'identifier l'origine de la membrane de la vésicule virale dans le lumen du MVB. Pour cela, il est possible d'utiliser des marqueurs fluorescents et d'observer les vésicules par microscopie confocale [69].

Jusqu'à présent, les fonctions de la protéine 6K1 ne sont pas connues, bien qu'elle soit essentielle à l'infectivité des Potyvirus [70]. 6K1 est cependant observée au niveau des vésicules virales et peut interagir avec la protéine 6K2 [71]. La protéine 6K1, portant un domaine hydrophobe comme 6K2 pourrait être impliquée dans le recrutement d'autres protéines associées au trafic membranaire. Les constructions utilisées lors de cette étude n'ont pas permis de mettre en place de crible d'interaction avec la protéine 6K1. D'autres constructions sont disponibles permettant un ancrage de protéines dans la membrane plus efficace et pourraient être utilisées afin de réaliser un crible d'interaction avec la protéine 6K1 [72,73].

La compréhension des mécanismes associés à la réplication virale chez les plantes permet de rechercher des allèles bloquants partiellement ou totalement la capacité des virus à utiliser les protéines de leurs hôtes. Les résultats que nous avons obtenus qui montrent l'interaction des protéines CmVPS28, CmVPS2, CmVPS24 et CmVPS4 avec la protéine 6K2 du WMV, s'inscrivent dans cet objectif.

Dans le cas de la protéine VPS4, nous avons démontré que la résistance au WMV est apportée chez le melon par l'allèle *Vps4*^{P30R}. Un autre allèle de VPS4 chez le concombre a déjà été identifié pour apporter une résistance au ZYMV [22]. Les substitutions sur ces deux allèles sont situées sur le même domaine protéique et sur la même structure secondaire. Or nous avons pu voir que l'allèle *Vps4*^{P30R} n'apporte pas de résistance au ZYMV. Cela soulève deux questions : (1) L'allèle de résistance au ZYMV chez le concombre est-il transposable chez le melon ? et inversement ; (2) Est-il possible de superposer les deux résistances dans un même allèle ? Pour répondre à ces deux questions, la transformation génétique est actuellement l'approche la plus efficace. Il sera nécessaire de mettre en place une double transformation pour apporter le transgène et éliminer l'endogène. Il est également possible de se limiter à une étape de transformation génétique par mutagenèse dirigée CRISPR-nCas9 ou CRISPR-X, permettant d'induire des mutations ponctuelles [74–76].

Nous avons également montré l'interaction de la protéine VPS4 d'*A. thaliana* avec la protéine 6K2 du TuMV. En plus de valider l'interaction VPS4/6K2, cette approche met en évidence un troisième Potyvirus impliquant VPS4 dans son cycle de réplication. On retrouve également l'implication de la protéine VPS4 dans la réplication du *Tombusvirus* TBSV [28]. Ainsi le spectre de résistance pouvant être apporté par VPS4 peut s'étendre sur deux familles de virus du groupe des virus à ARNs(+). Afin d'étudier si le spectre de résistance impliquant VPS4, et plus largement l'ESCRT s'étend à l'ensemble des virus à ARNs(+), il est possible d'utiliser un allèle dominant-négatif de *Vps4* exprimé de manière transitoire comme inhibiteur de l'ESCRT et d'observer la capacité d'un virus à se répliquer. Cette approche a été utilisée pour mettre en évidence le rôle de l'ESCRT lors de l'infection du TBSV [77,78].

Dans le cas des protéines CmVPS28, CmVPS2 et CmVPS24, une première approche d'interaction a montré leur recrutement par la protéine 6K2 du WMV. A l'instar des approches mises en place pour caractériser l'allèle *CmVps4* de résistance au WMV, il serait intéressant de rechercher des allèles des gènes codant pour CmVPS28, CmVPS2 et CmVPS24 au sein de la diversité naturelle et induite du melon. Il serait rapidement possible de phénotyper ces accessions pour la résistance au WMV. De plus, si l'approche de BiFC dans le système orthologue *A. thaliana*/TuMV met en évidence les mêmes interactions, il sera possible d'étudier ces résistances vis-à-vis de plusieurs virus et sur plusieurs espèces de plantes.

Les approches d'interactions protéiques sont essentielles à la compréhension des mécanismes de répllication des virus dans leurs hôtes. Au regard de l'interaction VPS4/6K2 mise en évidence dans ces travaux et de la résistance au WMV apporté par la substitution P30R sur la protéine VPS4 chez le melon, il serait intéressant d'identifier si la résistance est due à la perte d'interaction entre les deux protéines. Pour cela, il est possible de réutiliser les approches de SU-Y2H et BiFC en utilisant l'allèle CmVPS4^{P30R}. Il est également possible de générer la substitution par mutagenèse chez *Arabidopsis thaliana*.

Le développement de nouvelles variétés résistantes nécessite de longues étapes de caractérisation de gènes limitant la capacité des virus à se répliquer dans leurs hôtes. Le cycle de reproduction des plantes étant le premier facteur limitant dans le temps de développement.

La recherche de résistance par l'identification de perte d'interaction entre les protéines virales et les protéines de l'hôte peut s'avérer être un outil efficace dans la recherche d'allèle de résistance. Par exemple, il aurait été possible de cribler l'ensemble des familles EMS de melon portant une mutation non-synonyme sur le gène *Vps4*. Cela aurait permis de supprimer les étapes de multiplication pour les allèles dont la mutation ne permet pas la perte d'interaction avec la protéine 6K2. Cette approche peut être généralisée à toutes les plantes et tous les virus, entre un gène de sensibilité et une protéine virale. Elle est également moins contraignante que la complémentation de sensibilité, impliquant la transformation du virus.

Références :

- [1] McKirdy SJ, Jones RAC, Nutter FW. Quantification of yield losses caused by Barley yellow dwarf virus in wheat and oats. *Plant Dis* 2002;86:769–73. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.7.769>.
- [2] Lecoq H, Desbiez C. Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region. An Ever-Changing Picture. vol. 84. 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00003-8>.
- [3] Thresh JM. Virus and Virus-like diseases of Major Crops in Developing Countries. vol. 1. Springer; 2003. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0791-7>.
- [4] Popp, J., Hantos K. STUDIES IN AGRICULTURAL ECONOMICS. *Stud Agric Econ* 2011:47–66.
- [5] Chakrabortya S., Tiedemann V, Teng S. Climate change: potential impact on plant diseases. *Environ Pollut* 2000;108:317–26.
- [6] Gregory PJ, Johnson SN, Newton AC, Ingram JSI. Integrating pests and pathogens into the climate change/food security debate. *J Exp Bot* 2009;60:2827–38. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp080>.
- [7] Tilman D, Cassman KG, Matson P a, Naylor R, Polasky S. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 2002;418:671–7. <https://doi.org/10.1038/nature01014>.
- [8] Dinar A, Zilberman D. Impact of Pesticides on Farmer Health and the Rice Environment. *J Petrol* 1995;369:1689–99. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [9] Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P. Emerging infectious diseases of plants: Pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol* 2004;19:535–44. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.021>.
- [10] Caligari PDS, Forster BP. *Plant Breeding and Crop Improvement*. ELS John Wiley Sons 2015:1–8. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002024.pub2>.
- [11] Jove HS and J. Interactions Between Plant and Virus Proteomes in Susceptible Hosts: Identification of new targets for Antiviral Strategies. *BIOTECHNOLOGY AND PLANT DISEASE MANAGEMENT*; 2007.
- [12] Dempewolf H, Baute G, Anderson J, Kilian B, Smith C, Guarino L. Past and future use of wild relatives in crop breeding. *Crop Sci* 2017;57:1070–82. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.10.0885>.
- [13] Revers F, García JA. *Molecular biology of potyviruses*. vol. 92. 1st ed. Elsevier Inc.; 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.006>.
- [14] Riechmann JL, Lain S, Garcia JA. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* 1992;73:1–16. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-1-1>.
- [15] Oana D, Ziegler A, Torrance L, Gasemi S, Danci M. Potyviridae Family – short review. *J Hortic For Biotechnol* 2009;13:410–21.
- [16] Roossinck MJ. Plant RNA virus evolution. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:406–9. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00087-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00087-0).
- [17] Nieto C, Piron F, Dalmais M, Marco CF, Moriones E, Gómez-Guillamón ML, et al. EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biol* 2007;7:1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-34>.
- [18] Robaglia C, Caranta C. Translation initiation factors: A weak link in plant RNA virus

- infection. *Trends Plant Sci* 2006;11:40–5.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.004>.
- [19] Bastet A, Robaglia C, Gallois JL. eIF4E Resistance: Natural Variation Should Guide Gene Editing. *Trends Plant Sci* 2017;22:411–9.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.01.008>.
- [20] Tuttle McGrath M. Diseases of Cucurbits and their Management. *Dis Fruits Veg Vol I* 2006;l:455–510. https://doi.org/10.1007/1-4020-2606-4_12.
- [21] Dogimont C. 2011 Gene List for Melon. *Cucurbit Genet Coop Rep* 33-34 2011;133:104–33.
- [22] Amano M, Mochizuki A, Kawagoe Y, Iwahori K, Niwa K, Svoboda J, et al. High-resolution mapping of *zym*, a recessive gene for Zucchini yellow mosaic virus resistance in cucumber. *Theor Appl Genet* 2013;126:2983–93.
<https://doi.org/10.1007/s00122-013-2187-5>.
- [23] Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery. *Curr Biol* 2012;22:R116–20.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.028>.
- [24] Piper RC, Katzmann DJ. Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:519–47.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123319>.
- [25] Otegui MS, Spitzer C. Endosomal functions in plants. *Traffic* 2008;9:1589–98.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00787.x>.
- [26] Diaz A, Zhang J, Ollwerther A, Wang X, Ahlquist P. Host ESCRT proteins are required for bromovirus RNA replication compartment assembly and function. *PLoS Pathog* 2015;11:e1004742. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004742>.
- [27] Barajas D, Jiang Y, Nagy PD. A unique role for the host ESCRT proteins in replication of Tomato bushy stunt virus. *PLoS Pathog* 2009;5.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000705>.
- [28] Barajas D, Martín IF de C, Pogany J, Risco C, Nagy PD. Noncanonical Role for the Host Vps4 AAA+ ATPase ESCRT Protein in the Formation of Tomato Bushy Stunt Virus Replicase. *PLoS Pathog* 2014;10:24–32.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004087>.
- [29] Jiang J, Patarroyo C, Garcia Cabanillas D, Zheng H, Laliberté J-F. The Vesicle-Forming 6K 2 Protein of Turnip Mosaic Virus Interacts with the COPII Coatomer Sec24a for Viral Systemic Infection. *J Virol* 2015;89:6695–710. <https://doi.org/10.1128/JVI.00503-15>.
- [30] Garcia CD, Jiang J, Movahed N, Germain H, Yasuyuki Yamaji HZ, Laliberté J-F. Turnip mosaic virus uses the snare protein vti11 in an unconventional route for replication vesicle trafficking. *Plant Cell* 2018;30:2594–615.
<https://doi.org/10.1105/tpc.18.00281>.
- [31] Martínez F, Rodrigo G, Aragonés V, Ruiz M, Lodewijk I, Fernández U, et al. Interaction network of Tobacco etch potyvirus NIa protein with the host proteome during infection. *BMC Genomics* 2016;17:87. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2394-y>.
- [32] Bosque G, Folch-Fortuny A, Picó J, Ferrer A, Elena SF. Topology analysis and visualization of Potyvirus protein-protein interaction network. *BMC Syst Biol* 2014;8:129. <https://doi.org/10.1186/s12918-014-0129-8>.
- [33] Elena SF, Rodrigo G. Towards an integrated molecular model of plant-virus interactions. *Curr Opin Virol* 2012;2:713–8.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.09.004>.
- [34] Hurley JH, Emr SD. THE ESCRT COMPLEXES: Structure and Mechanism of a Membrane-

- Trafficking Network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2006;35:277–98. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.102126>.
- [35] Azmi IF, Davies BA, Xiao J, Babst M, Xu Z, Katzmann DJ. ESCRT-III Family Members Stimulate Vps4 ATPase Activity Directly or via Vta1. *Dev Cell* 2008;14:50–61. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.10.021>.
- [36] Palomares-Rius FJ, Viruel MA, Yuste-Lisbona FJ, Lopez-Sese AI, Gomez-Guillamon ML. Simple sequence repeat markers linked to QTL for resistance to Watermelon mosaic virus in melon. *Theor Appl Genet* 2011;123:1207–14. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1660-2>.
- [37] Kassem MA, Gosalvez B, Garzo E, Fereres A, Gómez-Guillamón ML, Aranda MA. Resistance to Cucurbit aphid-borne yellows virus in Melon Accession TGR-1551. *Phytopathology* 2015;105:1389–96. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-15-0041-R>.
- [38] Yuste-Lisbona FJ, López-Sesé AI, Gómez-Guillamón ML. Inheritance of resistance to races 1, 2 and 5 of powdery mildew in the melon TGR-1551. *Plant Breed* 2010;129:72–5. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01655.x>.
- [39] Peng HC, Walker GP. Sieve element occlusion provides resistance against *Aphis gossypii* in TGR-1551 melons. *Insect Sci* 2020;27:33–48. <https://doi.org/DOI.10.1111/1744-7917.12610>.
- [40] Pérez-de-Castro A, Esteras C, Alfaro-Fernández A, Daròs JA, Monforte AJ, Picó B, et al. Fine mapping of wmv 1551, a resistance gene to Watermelon mosaic virus in melon. *Mol Breed* 2019;39. <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0998-z>.
- [41] Boualem A, Fleurier S, Troadec C, Audigier P, Kumar APK, Chatterjee M, et al. Development of a *Cucumis sativus* TILLING platform for forward and reverse genetics. *PLoS One* 2014;9:3–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097963>.
- [42] Wei T, Wang A. Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *J Virol* 2008;82:12252–64. <https://doi.org/10.1128/JVI.01329-08>.
- [43] Wei T, Zhang C, Hou X, Sanfaçon H, Wang A. The SNARE Protein Syp71 Is Essential for Turnip Mosaic Virus Infection by Mediating Fusion of Virus-Induced Vesicles with Chloroplasts. *PLoS Pathog* 2013;9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003378>.
- [44] Wei T, Huang T-S, McNeil J, Laliberte J-F, Hong J, Nelson RS, et al. Sequential Recruitment of the Endoplasmic Reticulum and Chloroplasts for Plant Potyvirus Replication. *J Virol* 2010;84:799–809. <https://doi.org/10.1128/JVI.01824-09>.
- [45] Duden R. ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function. *Mol Membr Biol* 2003;20:197–207. <https://doi.org/10.1080/0968768031000122548>.
- [46] Manuscript A. Organization of the ER–Golgi interface for membrane traffic control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013. <https://doi.org/10.1038/nrm3588>.
- [47] Sanfaçon H. Replication of positive-strand RNA viruses in plants: contact points between plant and virus components. *Can J Bot* 2005;83:1529–49. <https://doi.org/10.1139/b05-121>.
- [48] Duprat A, Caranta C, Revers F, Menand B, Browning KS, Robaglia C. The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J* 2002;32:927–34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01481.x>.
- [49] Laliberté J-F, Sanfaçon H. Cellular Remodeling During Plant Virus Infection. *Annu Rev Phytopathol* 2010;48:69–91. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114239>.
- [50] Knoops K, Kikkert M, Van Den Worm SHE, Zevenhoven-Dobbe JC, Van Der Meer Y,

- Koster AJ, et al. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* 2008;6:1957–74. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060226>.
- [51] Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CKE, Walther P, et al. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe* 2009;5:365–75. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>.
- [52] Blanchard E, Roingard P. Virus-induced double-membrane vesicles. *Cell Microbiol* 2015;17:45–50. <https://doi.org/10.1111/cmi.12372>.
- [53] Verchot J. Wrapping membranes around plant virus infection. *Curr Opin Virol* 2011;1:388–95. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.09.009>.
- [54] Wan J, Basu K, Mui J, Vali H, Zheng H, Laliberté J-F. Ultrastructural Characterization of Turnip Mosaic Virus-Induced Cellular Rearrangements Reveals Membrane-Bound Viral Particles Accumulating in Vacuoles. *J Virol* 2015;89:12441–56. <https://doi.org/10.1128/jvi.02138-15>.
- [55] McCartney AW, Greenwood JS, Fabian MR, White KA, Mullen RT. Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *Plant Cell* 2005;17:3513–31. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036350>.
- [56] Cotton S, Grangeon R, Thivierge K, Mathieu I, Ide C, Wei T, et al. Turnip Mosaic Virus RNA Replication Complex Vesicles Are Mobile, Align with Microfilaments, and Are Each Derived from a Single Viral Genome. *J Virol* 2009;83:10460–71. <https://doi.org/10.1128/JVI.00819-09>.
- [57] Movahed N, Cabanillas DG, Wan J, Vali H, Laliberté JF, Zheng H. Turnip mosaic virus components are released into the extracellular space by vesicles in infected leaves. *Plant Physiol* 2019;180:1375–88. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00381>.
- [58] Wan J, Laliberté JF. Membrane-associated virus replication complexes locate to plant conducting tubes. *Plant Signal Behav* 2015;10. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1042639>.
- [59] Grangeon R, Jiang J, Wan J, Agbeci M, Zheng H, Laliberté JF. 6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection. *Front Microbiol* 2013;4:1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00351>.
- [60] Davies BA, Babst M, Katzmann DJ. Regulation of Vps4 during MVB Sorting and Cytokinesis. *Growth (Lakeland)* 2008;23:1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- [61] Díaz-Pendón JA, Fernández-Muñoz R, Gómez-Guillamón ML, Moriones E. Inheritance of Resistance to Watermelon mosaic virus in Cucumis melo that Impairs Virus Accumulation, Symptom Expression, and Aphid Transmission. *Phytopathology* 2005;95:840–6. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0840>.
- [62] Grangeon R, Jiang J, Laliberté JF. Host endomembrane recruitment for plant RNA virus replication. *Curr Opin Virol* 2012;2:683–90. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.10.003>.
- [63] Gu Y, Zavaliev R, Dong X. Membrane Trafficking in Plant Immunity. *Mol Plant* 2017;10:1026–34. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.001>.
- [64] Inada N, Ueda T. Membrane trafficking pathways and their roles in plant-microbe interactions. *Plant Cell Physiol* 2014;55:672–86. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu046>.
- [65] Gonzalez-Ibeas D, Canizares J, Aranda M a. Microarray Analysis Shows That Recessive Resistance to Watermelon mosaic virus in Melon Is Associated with the Induction of Defense Response Genes. *Mol Plant-Microbe Interact* 2012;25:107–18.

- <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-11-0193>.
- [66] Lin JS, Lai EM. Protein–protein interactions: Co-immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 2017;1615:211–9. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_17.
- [67] Hall RA. Studying protein-protein interactions via blot overlay/far western blot. *Methods Mol Biol* 2015;1278:371–9. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2425-7_24.
- [68] Salomon S, Grunewald D, Stüber K, Schaaf S, MacLean D, Schulze-Lefert P, et al. High-throughput confocal imaging of intact live tissue enables quantification of membrane trafficking in arabidopsis. *Plant Physiol* 2010;154:1096–104. <https://doi.org/10.1104/pp.110.160325>.
- [69] Held MA, Boulaflous A, Brandizzi F. Advances in fluorescent protein-based imaging for the analysis of plant endomembranes. *Plant Physiol* 2008;147:1469–81. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120147>.
- [70] Waltermann A, Maiss E. Detection of 6K1 as a mature protein of 6 kDa in plum pox virus-infected *Nicotiana benthamiana*. *J Gen Virol* 2006;87:2381–6. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81873-0>.
- [71] Cui H, Wang A. Plum Pox Virus 6K1 Protein Is Required for Viral Replication and Targets the Viral Replication Complex at the Early Stage of Infection. *J Virol* 2016;90:5119–31. <https://doi.org/10.1128/JVI.00024-16>.
- [72] Lentze N, Auerbach D. Membrane-based yeast two-hybrid system to detect protein interactions. *Curr Protoc Protein Sci* 2008:1–28. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1917s52>.
- [73] Zhang B, Karnik R, Donald N, Blatt MR. A GPI signal peptide-anchored split-ubiquitin (GPS) system for detecting soluble bait protein interactions at the membrane. *Plant Physiol* 2018;178:13–7. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00577>.
- [74] Hess GT, Frésard L, Han K, Lee CH, Li A, Cimprich KA, et al. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. *Nat Methods* 2016;13:1036–42. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4038>.
- [75] Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Van Eck J. Efficient Gene Editing in Tomato in the First Generation Using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 System. *Plant Physiol* 2014;166:1292–7. <https://doi.org/10.1104/pp.114.247577>.
- [76] Hess GT, Tycko J, Yao D, Bassik MC. Methods and Applications of CRISPR-Mediated Base Editing in Eukaryotic Genomes. *Mol Cell* 2017;68:26–43. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.029>.
- [77] Kovalev N, Martín IF de C, Pogany J, Barajas D, Pathak K, Risco C, et al. The role of viral RNA and co-opted cellular ESCRT-I and ESCRT-III factors in formation of tombusvirus spherules harboring the tombusvirus replicase. *J Virol* 2016;90:JVI.02775-15. <https://doi.org/10.1128/JVI.02775-15>.
- [78] Broniarczyk J, Pim D, Massimi P, Bergant M, Gozdicka-Józefiak A, Crump C, et al. The VPS4 component of the ESCRT machinery plays an essential role in HPV infectious entry and capsid disassembly. *Sci Rep* 2017;7:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep45159>.

Données Supplémentaires

<i>Primer Ref.</i>	Primer sequence	Length	
Z5532F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGTATAGCAATTTCAAGGAGCAAGCT	48	5'-vps4cm_Sfil-BT3-N
Z5532R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTCAACCTTCCTCCCAAACCTC	42	3'-vps4cm_Sfil-BT3-N
Z5592F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGAGTTTCTCTTCGGCAAGCG	44	5'-vps2.1cm_Sfil-BT3-N
Z5592R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTACATTCTCTTAAATTGTCTAGCCTGG	50	3'-vps2.1cm_Sfil-BT3-N
Z5593F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGAGCTTCTCTTTGGCAGC	42	5'-vps2.2cm_Sfil-BT3-N
Z5593R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTACATCTTCTCAAGTTATCAAGTCTAGCC	52	3'-vps2.2cm_Sfil-BT3-N
Z5594F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGAATATCTTCTCGAAGAAACCCACA	48	5'-vps2.3cm_Sfil-BT3-N
Z5594R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTCAAGGATTCGAAGAGCAGCC	43	3'-vps2.3cm_Sfil-BT3-N
Z5595F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGTTTAAACAGGCTTTTGGTAAACCT	48	5'-vps32.1cm_Sfil-BT3-N
Z5595R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTAGAGTGCATCTCAGCTTGC	43	3'-vps32.1cm_Sfil-BT3-N
Z5596F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGTCCATGCTCAATAAGCTTTTGG	47	5'-vps32.2cm_Sfil-BT3-N
Z5596R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTCAGAGTGCATCTCAGCCTG	42	3'-vps32.2cm_Sfil-BT3-N
Z5597F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGAGAAAATGATGAACATCTGAAGCC	50	5'-vps24.1cm_Sfil-BT3-N
Z5597R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTATGATCTAACTTTTGAAGACGAGCCC	50	3'-vps24.1cm_Sfil-BT3-N
Z5598F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGGGAATTTATTCGTCAAGAAGCC	47	5'-vps20.1cm_Sfil-BT3-N
Z5598R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTAAATGACTAACCGGACAACCC	44	3'-vps20.1cm_Sfil-BT3-N
Z5599F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGCCGACCGCTTCCCGCC	41	5'-vps36cm_Sfil-BT3-N
Z5599R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTATTTCCGCTATTACCAATAGTGGCC	49	3'-vps36cm_Sfil-BT3-N
Z5600F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGAGGCGGAGACCTGGC	39	5'-vps25cm_Sfil-BT3-N
Z5600R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTAGGCATCAGTTGTGAGAGAAGATGAG	49	3'-vps25cm_Sfil-BT3-N
Z5601F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGAGGCGGAGACCTGGC	39	5'-vps22cm_Sfil-BT3-N
Z5601R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTAGGCATCAGTTGTGAGAGAAGATG	47	3'-vps22cm_Sfil-BT3-N
Z5602F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGGTAACACGGAGAAATTGTTG	45	5'-vps37.1cm_Sfil-BT3-N
Z5602R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTACCCTCTCGCCTTAAGCTC	42	3'-vps37.1cm_Sfil-BT3-N
Z5603F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGTTCAAGTTTGGGGATCTCAGG	46	5'-vps37.2cm_Sfil-BT3-N
Z5603R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTACCTTTGTCTTCAATGCAGAAATAATGCC	54	3'-vps37.2cm_Sfil-BT3-N
Z5604F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGAGGTCAAGCTTTGGAACG	43	5'-vps28.1cm_Sfil-BT3-N
Z5604R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTCAAGTACCAGCAGTAGGCAAAGC	45	3'-vps28.1cm_Sfil-BT3-N
Z5605F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGGTAACACGGAGAAATTGTTG	45	5'-vps23.1cm_Sfil-BT3-N
Z5605R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTACCCTCTCGCCTTAAGCTC	42	3'-vps23.1cm_Sfil-BT3-N
Z5606F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGTACCGTCGCCGTCC	39	5'-vps23.2cm_Sfil-BT3-N
Z5606R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTCAGCCATTAGAATACTGAGAAATCCG	48	3'-vps23.2cm_Sfil-BT3-N
Z5607F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGCTCGCCATCTTCGAGAA	41	5'-BRO1cm_Sfil-BT3-N
Z5607R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTAGACTCTAAAGGATATATGTTGAGAAAC	51	3'-BRO1cm_Sfil-BT3-N
Z5625F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGAGTGCCGCTACGGAAG	40	5'-IST1-L3cm_Sfil-BT3-N
Z5625R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTCAGTTTTCTGTACTTGAGAGC	45	3'-IST1-L3cm_Sfil-BT3-N
Z5626F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGCTACTCTCAATCAACTC	42	5'-IST1-L2cm_Sfil-BT3-N
Z5626R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTCAGCACTCCGAAGTTTGTCC	42	3'-IST1-L2cm_Sfil-BT3-N

Table S1 : Liste des primers partie 1

<i>Primer Ref.</i>	Primer sequence	Length	
Z5534F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCAGCAAACATGAGGTCAGCAAG	42	5'_6k2_pBT3-N
Z5534R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTCATTGAGTTGTGACTGGCTCACG	45	3'_6k2_pBT3-N+TCA (stop)
Z5630F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGAGCAAACATGAGGTCAGCAAG	45	5'_6k2_pBT3-SUC
Z5630R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCCTTGAGTTGTGACTGGCTCACG	44	3'_6k2_pBT3-SUC
Z5631F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCAGCAAACATGAGGTCAGCAAG	42	5'_6k2_pBT3-STE
Z5631R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCCTTGAGTTGTGACTGGCTCACG	44	3'_6k2_pBT3-STE
Z5533F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCGCTAAAACAGCCACGCAACTG	42	5'_6k1_pBT3-N
Z5533R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTCACTGCACCTTAACTTCCTCACCCA	47	3'_6k1_pBT3-N+tca(stop)
Z5608F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGCTAAAACAGCCACGCAACTG	45	5'_6k1_pBT3-SUC
Z5629R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCCTGCACCTTAACTTCCTCACCCA	46	3'_6k1_pBT3-SUC
Z5609F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCGCTAAAACAGCCACGCAACTG	42	5'_6k1_pBT3-STE
Z5609R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCCTGCACCTTAACTTCCTCACCCA	46	3'_6k1_pBT3-STE
Z5499F	GGAGATATTCAACACTATTCCACATCATGTATAGCAATTTCAAGGAGCAAGC	53	VPS4_CM 5'ATG + WMV LL1A-NotI recombination site 5'
Z5537R	GTGTCGGACTGCAGGGACACTGATTCACCTTCTCCCAAACCTC	45	VPS4_CM 3' + noSTOP + WMV LL1A-NotI recombination site 3'
Z5500F	GTGGTGCGAGGTAGAAAGAATGG	23	5'pWMV-VPS4_cm for sequencing
Z5500R	GAGCATCAATTCGTGTTGCATC	23	3'pWMV-VPS4_cm for sequencing
Z5538F	ATGTATAGCAATTTCAAGGAGCAAGC	26	5'-CmVps4_CDS
Z5538R	TCAACCTTCTCCCAAACCTC	21	3'-CmVps4_CDS
	CACCATGGCTGCGGTTCCGCCTG	23	5'-AtVps4_CDS
	ACCTTCTTCCAAACTCCTG	19	3'-AtVps4_CDS

Table S2 : Liste des primers partie 2

Plasmid	Selection gene	Origin
<i>pBT3-N</i>	kanR	INRAE Bordeaux / Université de Bordeaux - UMR1332
<i>pBT3-SUC</i>	kanR	INRAE Bordeaux / Université de Bordeaux - UMR1332
<i>pBT3-STE</i>	kanR	INRAE Bordeaux / Université de Bordeaux - UMR1332
<i>pBT3-N-6K1</i>	kanR	Laboratory construct
<i>pBT3-SUC-6k1</i>	kanR	Laboratory construct
<i>pBT3-STE-6k1</i>	kanR	Laboratory construct
<i>pBT3-N-6K2</i>	kanR	Laboratory construct
<i>pBT3-SUC-6k2</i>	kanR	Laboratory construct
<i>pBT3-STE-6k2</i>	kanR	Laboratory construct
<i>pPR3-N</i>	ampR	INRAE Bordeaux / Université de Bordeaux - UMR1332
<i>pPR3-N-Vps4</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps2.1</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps2.2</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps2.3</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps32.1</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps32.2</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps24.1</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps20.1</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps36</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps25</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps22</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps37.1</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps37.2</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps28.1</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps23.1</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-Vps23.2</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-BRO1</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-IST1L3</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPR3-N-IST1L2</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pYESTrp3-WMV</i>	ampR	INRAE PACA / Pathologie Végétale
<i>pYESTrp3-WMV-GFP</i>	ampR	INRAE PACA / Pathologie Végétale
<i>pYESTrp3-WMV-VPS4Wt</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pYESTrp3-WMV-VPS4P30R</i>	ampR	Laboratory construct
<i>pPsite nEYFP C1</i>	SpecR	INRAE Bordeaux / Université de Bordeaux - UMR1332
<i>pPsite cEYFP C1</i>	SpecR	INRAE Bordeaux / Université de Bordeaux - UMR1332
<i>pPsite nEYFP N1</i>	SpecR	INRAE Bordeaux / Université de Bordeaux - UMR1332
<i>pPsite cEYFP N1</i>	SpecR	INRAE Bordeaux / Université de Bordeaux - UMR1332

Table S3 : Liste des plasmides

Similarity/identity VPS4 full lenght													
	B.o	A.t	C.m 1	C.m 2	M.c 1	M.c 2	C.l	C.melo	C.mo	C.sati			
Brassica oleracea var. oleracea	100% / 100%	98,2% / 95,6%	96,3% / 89,4%	96,8% / 89,1%	96,3% / 89,1%	96,5% / 88,4%	96,1% / 88,7%	96,3% / 88,4%	96,8% / 89,1%	96,1% / 88,4%			
Arabidopsis thaliana	98,2% / 95,6%	100% / 100%	97,5% / 90,3%	97,9% / 90,1%	97,5% / 90,1%	97,7% / 89,1%	97,7% / 89,8%	97,5% / 89,6%	97,9% / 90,3%	97,2% / 89,6%			
Cucurbita maxima LOC111490739	96,3% / 89,4%	97,5% / 90,3%	100% / 100%	99,5% / 97,5%	100% / 99,8%	99,5% / 97,5%	99,8% / 98,6%	100% / 97,9%	99,5% / 97,7%	99,8% / 97,9%			
Cucurbita maxima LOC111483960	96,8% / 89,1%	97,9% / 90,1%	99,5% / 97,5%	100% / 100%	99,5% / 97,7%	99,1% / 96,8%	99,3% / 98,2%	99,5% / 98,2%	100% / 99,8%	99,3% / 97,7%			
Momordica charantia LOC111794858	96,3% / 89,1%	97,5% / 90,1%	100% / 99,8%	99,5% / 97,7%	100% / 100%	99,5% / 97,7%	99,8% / 98,8%	100% / 98,2%	99,5% / 97,9%	99,8% / 98,2%			
Momordica charantia LOC111020632	96,5% / 88,4%	97,7% / 89,1%	99,5% / 97,5%	99,1% / 96,8%	99,5% / 97,7%	100% / 100%	99,3% / 98,2%	99,5% / 97,7%	99,1% / 97%	99,3% / 97,9%			
Citrus lanatus	96,1% / 88,7%	97,7% / 89,8%	99,8% / 98,6%	99,3% / 98,2%	99,8% / 98,8%	99,3% / 98,2%	100% / 100%	99,8% / 99,1%	99,3% / 98,4%	99,5% / 98,6%			
Cucumis melo DHL92	96,3% / 88,4%	97,5% / 89,6%	100% / 97,9%	99,5% / 98,2%	100% / 98,2%	99,5% / 97,7%	99,8% / 99,1%	100% / 100%	99,5% / 98,4%	99,8% / 99,5%			
Cucurbita mochatata	96,8% / 89,1%	97,9% / 90,3%	99,5% / 97,7%	100% / 99,8%	99,5% / 97,9%	99,1% / 97%	99,3% / 98,4%	99,5% / 98,4%	100% / 100%	99,3% / 97,9%			
Cucumis sativus	96,1% / 88,4%	97,2% / 89,6%	99,8% / 97,9%	99,3% / 97,7%	99,8% / 98,2%	99,3% / 97,2%	99,5% / 98,6%	99,8% / 99,5%	99,3% / 97,9%	100% / 100%			
Citrus clementina	96,8% / 88,9%	97% / 89,2%	99,3% / 94,9%	98,8% / 93,5%	99,3% / 94,7%	99,1% / 94,7%	99,1% / 94,7%	99,3% / 94,7%	98,8% / 93,5%	99,1% / 94,7%			
Nicotiana attenuata	97,5% / 89,9%	96,8% / 88,7%	97% / 91%	97% / 90,1%	97% / 90,8%	97,2% / 90,3%	96,8% / 91%	97% / 90,8%	97% / 90,1%	96,8% / 91%			
Nicotiana tabacum	97,2% / 89,9%	96,5% / 88,7%	96,8% / 91,5%	96,8% / 90,5%	96,8% / 91,2%	97% / 90,8%	96,5% / 91,5%	96,8% / 91,2%	96,8% / 90,5%	96,5% / 91,5%			
Solanum lycopersicum 007170	94,7% / 87,1%	94,3% / 85,3%	95,2% / 87,1%	94,9% / 86,6%	95,2% / 86,8%	95,4% / 87,5%	94,9% / 87,3%	95,2% / 87,5%	94,9% / 86,6%	94,9% / 87,5%			
Solanum lycopersicum 067230	96,3% / 90%	96,3% / 89,3%	97% / 91,4%	97% / 90,5%	97% / 91,2%	97% / 90%	96,7% / 90,9%	97% / 90,7%	97% / 90,5%	96,7% / 90,9%			
Solanum lycopersicum 067240	96,8% / 90,5%	96,5% / 89,6%	97,2% / 91,6%	97,2% / 90,7%	97,2% / 91,4%	97% / 90%	97% / 91,2%	97,2% / 90,9%	97,2% / 90,7%	97% / 91,2%			
Vitis vinifera	95,8% / 88,9%	96,8% / 90,1%	97,9% / 94%	97,5% / 92,4%	97,9% / 93,8%	98,2% / 93,5%	97,7% / 94%	97,9% / 93,8%	97,5% / 92,6%	97,7% / 94%			
Lokiarchaeota archaeon	74,6% / 40,6%	74,3% / 40,3%	74,3% / 40,8%	74,3% / 40,6%	74,3% / 40,6%	74,3% / 40,8%	74,3% / 41,1%	74,3% / 41,1%	74,3% / 40,6%	74,1% / 40,8%			
Heimdallarchaeota archaeon	77,7% / 40,7%	77,4% / 40,7%	76,6% / 40,7%	76,6% / 40,4%	76,6% / 40,4%	76,6% / 40,4%	76,6% / 40,7%	76,6% / 40,7%	76,6% / 40,4%	76,3% / 40,7%			
Homo sapiens VPS4a	81% / 54,2%	81,2% / 54,9%	81,9% / 55,5%	82,1% / 55,2%	81,9% / 55,2%	81,9% / 55%	81,7% / 54,8%	81,9% / 54,5%	82,1% / 55%	81,7% / 54,5%			
Homo sapiens VPS4b	81,3% / 55,6%	81,8% / 55,4%	82,2% / 55,7%	82,4% / 55,5%	82,2% / 56%	82,2% / 56%	82% / 55,7%	82,2% / 55,3%	82,4% / 55,3%	82% / 55,3%			
Mustela erminea VPS4a	81,2% / 54,6%	81,5% / 55,1%	82,1% / 55,7%	82,4% / 55,5%	82,1% / 55,5%	82,1% / 55,2%	81,9% / 55%	82,1% / 54,8%	82,4% / 55,2%	81,9% / 54,8%			
Mustela erminea VPS4b	81,8% / 56,1%	82% / 55,8%	82% / 55,5%	82,4% / 55,5%	82% / 55,7%	82,2% / 55,7%	81,7% / 55,5%	82% / 55%	82,4% / 55,3%	81,7% / 55%			
Saccharomyces cerevisiae	82,7% / 54,9%	82,5% / 55,1%	82,9% / 55,5%	82,9% / 54,8%	82,9% / 55,3%	82,7% / 55,5%	82,7% / 55,3%	82,9% / 55,7%	82,9% / 55%	82,7% / 55,7%			
Schizosaccharomyces pombe	81,8% / 52,4%	82,1% / 52,4%	81,1% / 53%	81,6% / 53,4%	81,1% / 53,2%	81,3% / 53,4%	81,1% / 53,4%	81,1% / 53,7%	81,6% / 53,7%	80,9% / 53,7%			

Table S4 (1/3) : Table de comparaison des similarités/identités entre les protéines VPS4
 Les niveaux de similarité et d'identité des protéines VPS4 de chaque espèce présentent dans la table a été obtenu suite à l'alignement multiple de la protéine VPS4 complète.

		Similarity/Identity VPS4 full length										
		B.o	A.t	C.m 1	C.m 2	M.c 1	M.c 2	C.l	C.melo	C.mio	C.sati	
Brassica oleracea var. oleracea		100% / 100%	98,2% / 95,6%	96,3% / 89,4%	96,8% / 89,1%	96,3% / 89,1%	96,5% / 88,4%	96,1% / 88,7%	96,3% / 88,4%	96,8% / 89,1%	96,1% / 88,4%	
Arabidopsis thaliana		98,2% / 95,6%	100% / 100%	97,5% / 90,3%	97,9% / 90,1%	97,5% / 90,1%	97,7% / 89,1%	97,7% / 89,8%	97,5% / 89,6%	97,9% / 90,3%	97,2% / 89,6%	
Cucurbita maxima LOC111490739		96,3% / 89,4%	97,5% / 90,3%	100% / 100%	99,5% / 97,5%	100% / 99,8%	99,3% / 97,5%	99,8% / 98,6%	100% / 97,9%	99,5% / 97,7%	99,8% / 97,9%	
Cucurbita maxima LOC111483960		96,8% / 89,1%	97,9% / 90,1%	99,5% / 97,5%	100% / 100%	99,5% / 97,7%	99,1% / 96,8%	99,3% / 98,2%	99,5% / 98,2%	100% / 99,8%	99,3% / 97,7%	
Momordica charantia LOC111794858		96,3% / 89,1%	97,5% / 90,1%	100% / 99,8%	99,5% / 97,7%	100% / 100%	99,5% / 97,7%	99,8% / 98,8%	100% / 98,2%	99,5% / 97,9%	99,8% / 98,2%	
Momordica charantia LOC111020632		96,5% / 88,4%	97,7% / 89,1%	99,5% / 97,5%	99,1% / 96,8%	99,5% / 97,7%	100% / 100%	99,3% / 98,2%	99,5% / 97,7%	99,1% / 97%	99,3% / 97,2%	
Citrullus lanatus		96,1% / 88,7%	97,7% / 89,8%	99,8% / 98,6%	99,3% / 98,2%	99,8% / 98,8%	99,5% / 98,2%	100% / 100%	99,8% / 99,1%	99,3% / 98,4%	99,5% / 98,6%	
Cucumis melo DHL92		96,3% / 88,4%	97,5% / 89,6%	100% / 97,9%	99,5% / 98,2%	100% / 98,2%	99,5% / 97,7%	99,8% / 99,1%	100% / 100%	99,5% / 98,4%	99,8% / 99,5%	
Cucurbita mochatata		96,8% / 89,1%	97,9% / 90,3%	99,5% / 97,7%	100% / 99,8%	99,5% / 97,9%	99,1% / 97%	99,3% / 98,4%	99,5% / 98,4%	100% / 100%	99,3% / 97,9%	
Cucumis sativus		96,1% / 88,4%	97,2% / 89,6%	99,8% / 97,9%	99,3% / 97,7%	99,8% / 98,2%	99,3% / 97,2%	99,5% / 98,6%	99,8% / 99,5%	99,3% / 97,9%	100% / 100%	
Citrus clementina		96,8% / 88,9%	97% / 89,2%	99,3% / 94,9%	98,8% / 93,5%	99,3% / 94,7%	99,1% / 94,7%	99,1% / 94,7%	99,3% / 94,7%	98,8% / 93,5%	99,1% / 94,7%	
Nicotiana attenuata		97,5% / 89,9%	96,8% / 88,7%	97% / 91%	97% / 90,1%	97% / 90,8%	97,2% / 90,3%	96,8% / 91%	97% / 90,8%	97% / 90,1%	96,8% / 91%	
Nicotiana tabacum		97,2% / 89,9%	96,5% / 88,7%	96,8% / 91,5%	96,8% / 90,5%	96,8% / 91,2%	97% / 90,8%	96,5% / 91,5%	96,8% / 91,2%	96,8% / 90,5%	96,5% / 91,5%	
Solanum lycopersicum 007170		94,7% / 87,1%	94,3% / 85,3%	95,2% / 87,1%	94,9% / 86,6%	95,2% / 86,8%	95,4% / 87,5%	94,9% / 87,3%	95,2% / 87,5%	94,9% / 86,6%	94,9% / 87,5%	
Solanum lycopersicum 067230		96,3% / 90%	96,3% / 89,3%	97% / 91,4%	97% / 90,5%	97% / 91,2%	97% / 90%	96,7% / 90,9%	97% / 90,7%	97% / 90,5%	96,7% / 90,9%	
Solanum lycopersicum 067240		96,8% / 90,5%	96,5% / 89,6%	97,2% / 91,6%	97,2% / 90,7%	97,2% / 91,4%	97% / 90%	97% / 91,2%	97,2% / 90,9%	97,2% / 90,7%	97% / 91,2%	
Vitis vinifera		95,8% / 88,9%	96,8% / 90,1%	97,9% / 94%	97,5% / 92,4%	97,9% / 93,8%	98,2% / 93,5%	97,7% / 94%	97,9% / 93,8%	97,5% / 92,6%	97,7% / 94%	
Lokiarchaeota archaeon		74,6% / 40,6%	74,3% / 40,3%	74,3% / 40,8%	74,3% / 40,6%	74,3% / 40,6%	74,3% / 40,8%	74,3% / 41,1%	74,3% / 41,1%	74,3% / 40,6%	74,1% / 40,8%	
Heimdallarchaeota archaeon		77,7% / 40,7%	77,4% / 40,7%	76,6% / 40,7%	76,6% / 40,4%	76,6% / 40,4%	76,6% / 40,4%	76,6% / 40,7%	76,6% / 40,7%	76,6% / 40,4%	76,3% / 40,7%	
Homo sapiens VPS4a		81% / 54,2%	81,2% / 54,9%	81,9% / 55,5%	82,1% / 55,2%	81,9% / 55,2%	81,9% / 55%	81,7% / 54,8%	81,9% / 54,5%	82,1% / 55%	81,7% / 54,5%	
Homo sapiens VPS4b		81,3% / 55,6%	81,8% / 55,4%	82,2% / 55,7%	82,4% / 55,5%	82,2% / 56%	82,2% / 56%	82% / 55,7%	82,2% / 55,3%	82,4% / 55,3%	82% / 55,3%	
Mustela erminea VPS4a		81,2% / 54,6%	81,5% / 55,1%	82,1% / 55,7%	82,4% / 55,5%	82,1% / 55,5%	82,1% / 55,2%	81,9% / 55%	82,1% / 54,8%	82,4% / 55,2%	81,9% / 54,8%	
Mustela erminea VPS4b		81,8% / 56,1%	82% / 55,8%	82% / 55,5%	82,4% / 55,5%	82% / 55,7%	82,2% / 55,7%	81,7% / 55,5%	82% / 55%	82,4% / 55,3%	81,7% / 55%	
Saccharomyces cerevisiae		82,7% / 54,9%	82,5% / 55,1%	82,9% / 55,5%	82,9% / 54,8%	82,9% / 55,3%	82,7% / 55,5%	82,7% / 55,3%	82,9% / 55,7%	82,9% / 55%	82,7% / 55,7%	
Schizosaccharomyces_pombe		81,8% / 52,4%	82,1% / 52,4%	81,1% / 53,2%	81,6% / 53,4%	81,1% / 53,4%	81,3% / 53,4%	81,1% / 53,4%	81,1% / 53,7%	81,6% / 53,7%	80,9% / 53,7%	

Table S4 (2/3) : Table de comparaison des similarités/identités entre les protéines VPS4

Les niveaux de similarité et d'identité des protéines VPS4 de chaque espèce présent dans la table a été obtenu suite à l'alignement multiple de la protéine VPS4 complète.

Similarity/identity VPS4 full length									
		H.sb	M. ea	M. eb	S.c	S.p			
Brassica oleracea var. oleracea	B.o	81,3% / 55,6%	81,2% / 54,6%	81,8% / 56,1%	82,7% / 54,9%	81,8% / 52,4%			
Arabidopsis thaliana	A.t	81,8% / 55,4%	81,5% / 55,1%	82% / 55,8%	82,5% / 55,1%	82,1% / 52,4%			
Cucurbita maxima LOC111490739	C.m 1	82,2% / 55,7%	82,1% / 55,7%	82% / 55,5%	82,9% / 55,5%	81,1% / 53%			
Cucurbita maxima LOC111483960	C.m 2	82,4% / 55,5%	82,4% / 55,5%	82,4% / 55,5%	82,9% / 54,8%	81,6% / 53,4%			
Momordica charantia LOC111794858	M.c 1	82,2% / 56%	82,1% / 55,5%	82% / 55,7%	82,9% / 55,3%	81,1% / 53,2%			
Momordica charantia LOC111020632	M.c 2	82,2% / 56%	82,1% / 55,2%	82,2% / 55,7%	82,7% / 55,5%	81,3% / 53,4%			
Citrullus lanatus	C.l	82% / 55,7%	81,9% / 55%	81,7% / 55,5%	82,7% / 55,3%	81,1% / 53,4%			
Cucumis melo DHL92	C.melo	82,2% / 55,3%	82,1% / 54,8%	82% / 55%	82,9% / 55,7%	81,1% / 53,7%			
Cucurbita mochatata	C.mo	82,4% / 55,3%	82,4% / 55,2%	82,4% / 55,3%	82,9% / 55%	81,6% / 53,7%			
Cucumis sativus	C.sati	82% / 55,3%	81,9% / 54,8%	81,7% / 55%	82,7% / 55,7%	80,9% / 53,7%			
Citrus clementina	C.c	82% / 55,6%	81,5% / 54,6%	82,2% / 55,4%	82,9% / 56,3%	81,1% / 52,6%			
Nicotiana attenuata	N.a	81,8% / 54,8%	82,2% / 54,7%	82,1% / 54,8%	82,3% / 54,1%	81,4% / 52,2%			
Nicotiana tabacum	N.ta	81,6% / 54,8%	82,5% / 55%	81,8% / 54,8%	82,5% / 54,5%	81,6% / 52,7%			
Solanum lycopersicum 007170	S.l1	82,2% / 56,8%	81,7% / 55,1%	82,5% / 56,5%	83,9% / 54,7%	83,3% / 53,8%			
Solanum lycopersicum 067230	S.l2	81,7% / 54,7%	81,7% / 54,4%	81,7% / 54,7%	82,6% / 54,7%	81,1% / 51,8%			
Solanum lycopersicum 067240	S.l3	81,9% / 54,7%	81,9% / 54,4%	82,2% / 54,7%	83,1% / 54,7%	81,6% / 51,8%			
Vitis vinifera	V.v	82,7% / 55,7%	82,6% / 55,2%	82,9% / 56%	83,1% / 56,7%	81,3% / 52,7%			
Lokiarchaeota archaeon	L.a	74,9% / 41,5%	72,8% / 39,9%	74,4% / 41,2%	74,4% / 40,5%	74,9% / 40,5%			
Heimdallarchaeota archaeon	H.a	77,7% / 43,4%	75,6% / 44,2%	77,7% / 43,6%	80,6% / 46,9%	77,7% / 42,4%			
Homo sapiens VPS4a	H.sa	94,3% / 81,5%	99,8% / 98,9%	93,6% / 81,5%	84,8% / 60,6%	86,4% / 57,7%			
Homo sapiens VPS4b	H.sb	100% / 100%	94,5% / 81,9%	98,6% / 97,3%	85,1% / 61,4%	85,4% / 58,9%			
Mustela erminea VPS4a	M. ea	94,5% / 81,9%	100% / 100%	93,8% / 81,7%	85,1% / 60,4%	86,6% / 57,7%			
Mustela erminea VPS4b	M. eb	98,6% / 97,3%	93,8% / 81,7%	100% / 100%	84,6% / 61,1%	85,4% / 59,2%			
Saccharomyces cerevisiae	S.c	85,1% / 61,4%	85,1% / 60,4%	84,6% / 61,1%	100% / 100%	86,1% / 62,5%			
Schizosaccharomyces pombe	S.p	85,4% / 58,9%	86,6% / 57,7%	85,4% / 59,2%	86,1% / 62,5%	100% / 100%			

Table S4 (3/3) : Table de comparaison des similarités/identités entre les protéines VPS4

Les niveaux de similarité et d'identité des protéines VPS4 de chaque espèce présentent dans la table a été obtenu suite à l'alignement multiple de la protéine VPS4 complète.

Similarity/identity VPS4 MIT domain												
	B.o	A.t	C.m 1	C.m 2	M.c 1	M.c 2	C.l	C.melo	C.mo	C.sati		
Brassica oleracea var. oleracea	100% / 100%	100% / 98,8%	97,5% / 95%	97,5% / 93,8%	97,5% / 95%	97,5% / 95%	97,5% / 95%	97,5% / 93,8%	97,5% / 93,8%	97,5% / 93,8%		
Arabidopsis thaliana	100% / 98,8%	100% / 100%	97,5% / 93,8%	97,5% / 95%	97,5% / 93,8%	97,5% / 93,8%	97,5% / 93,8%	97,5% / 95%	97,5% / 95%	97,5% / 95%		
Cucurbita maxima LOC111490739	97,5% / 95%	97,5% / 93,8%	100% / 100%	100% / 98,8%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 98,8%	100% / 98,8%	100% / 98,8%		
Cucurbita maxima LOC111483960	97,5% / 93,8%	97,5% / 95%	100% / 98,8%	100% / 100%	100% / 98,8%	100% / 98,8%	100% / 98,8%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%		
Momordica charantia LOC111794858	97,5% / 95%	97,5% / 93,8%	100% / 100%	100% / 98,8%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 98,8%	100% / 98,8%	100% / 98,8%		
Momordica charantia LOC111020632	97,5% / 95%	97,5% / 93,8%	100% / 100%	100% / 98,8%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 98,8%	100% / 98,8%	100% / 98,8%		
Citrullus lanatus	97,5% / 95%	97,5% / 93,8%	100% / 100%	100% / 98,8%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 98,8%	100% / 98,8%	100% / 98,8%		
Cucumis melo DHL92	97,5% / 93,8%	97,5% / 95%	100% / 98,8%	100% / 100%	100% / 98,8%	100% / 98,8%	100% / 98,8%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%		
Cucurbita mochata	97,5% / 93,8%	97,5% / 95%	100% / 98,8%	100% / 100%	100% / 98,8%	100% / 98,8%	100% / 98,8%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%		
Cucumis sativus	97,5% / 93,8%	97,5% / 95%	100% / 98,8%	100% / 100%	100% / 98,8%	100% / 98,8%	100% / 98,8%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%		
Citrus dlementina	97,5% / 95%	97,5% / 93,8%	100% / 100%	100% / 98,8%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 98,8%	100% / 98,8%	100% / 98,8%		
Nicotiana attenuata	95% / 91,3%	95% / 90%	96,3% / 92,5%	96,3% / 91,3%	96,3% / 92,5%	96,3% / 92,5%	96,3% / 92,5%	96,3% / 91,3%	96,3% / 91,3%	96,3% / 91,3%		
Nicotiana tabacum	93,8% / 91,3%	93,8% / 90%	95% / 92,5%	95% / 91,3%	95% / 92,5%	95% / 92,5%	95% / 92,5%	95% / 91,3%	95% / 91,3%	95% / 91,3%		
Solanum lycopersicum 007170	92,5% / 88,8%	92,5% / 88,8%	93,8% / 90%	93,8% / 90%	93,8% / 90%	93,8% / 90%	93,8% / 90%	93,8% / 90%	93,8% / 90%	93,8% / 90%		
Solanum lycopersicum 067230	97,5% / 95%	97,5% / 93,8%	97,5% / 95%	97,5% / 93,8%	97,5% / 95%	97,5% / 95%	97,5% / 95%	97,5% / 93,8%	97,5% / 93,8%	97,5% / 93,8%		
Solanum lycopersicum 067240	98,8% / 95%	98,8% / 93,8%	98,8% / 95%	98,8% / 93,8%	98,8% / 95%	98,8% / 95%	98,8% / 95%	98,8% / 93,8%	98,8% / 93,8%	98,8% / 93,8%		
Vitis vinifera	98,8% / 95%	98,8% / 93,8%	97,5% / 97,5%	97,5% / 96,3%	97,5% / 97,5%	97,5% / 97,5%	97,5% / 97,5%	97,5% / 96,3%	97,5% / 96,3%	97,5% / 96,3%		
Lokiarchaeota archaeon	40% / 10%	40% / 10%	41,2% / 10%	41,2% / 10%	41,2% / 10%	41,2% / 10%	41,2% / 10%	41,2% / 10%	41,2% / 10%	41,2% / 10%		
Heimdallarchaeota archaeon	28,7% / 5%	28,7% / 5%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%		
Homo sapiens VPS4a	58,8% / 26,3%	58,8% / 26,3%	56,3% / 26,3%	56,3% / 26,3%	56,3% / 26,3%	56,3% / 26,3%	56,3% / 26,3%	56,3% / 26,3%	56,3% / 26,3%	56,3% / 26,3%		
Homo sapiens VPS4b	36,2% / 6,3%	36,2% / 6,3%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%		
Homo sapiens VPS4a	58,8% / 26,3%	58,8% / 26,3%	56,3% / 26,3%	56,3% / 26,3%	56,3% / 26,3%	56,3% / 26,3%	56,3% / 26,3%	56,3% / 26,3%	56,3% / 26,3%	56,3% / 26,3%		
Mustela erminea VPS4a	36,2% / 6,3%	36,2% / 6,3%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%		
Mustela erminea VPS4b	36,2% / 6,3%	36,2% / 6,3%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%		
Saccharomyces cerevisiae	32,5% / 5%	32,5% / 5%	31,3% / 3,8%	31,3% / 3,8%	31,3% / 3,8%	31,3% / 3,8%	31,3% / 3,8%	31,3% / 3,8%	31,3% / 3,8%	31,3% / 3,8%		
Schizosaccharomyces_pombe	36,2% / 6,3%	36,2% / 6,3%	35% / 6,3%	35% / 6,3%	35% / 6,3%	35% / 6,3%	35% / 6,3%	35% / 6,3%	35% / 6,3%	35% / 6,3%		

Table S5 (1/3) : Table de comparaison des similarités/identités entre les domaines MIT de la protéine VPS4

Les niveaux de similarité et d'identité des protéines VPS4 de chaque espèce présentent dans la table a été obtenu suite à l'alignement multiple du domaine MIT de la protéine VPS4.

Similarity/Identity VPS4 MIT domain													
		C.c	N.a	N.ta	S.I1	S.I2	S.I3	V.v	La	Ha	Ha	H.sa	
Brassica oleracea var. oleracea	B.o	97,5% / 95%	95% / 91,3%	93,8% / 91,3%	92,5% / 88,8%	97,5% / 95%	98,8% / 95%	98,8% / 95%	40% / 10%	28,7% / 5%	28,7% / 5%	58,8% / 26,3%	
Arabidopsis thaliana	A.t	97,5% / 93,8%	95% / 90%	93,8% / 90%	92,5% / 88,8%	97,5% / 93,8%	98,8% / 93,8%	98,8% / 93,8%	40% / 10%	28,7% / 5%	28,7% / 5%	58,8% / 26,3%	
Cucurbita maxima LOC111490739	C.m.1	100% / 100%	96,3% / 92,5%	95% / 92,5%	93,8% / 90%	97,5% / 95%	98,8% / 93,8%	97,5% / 97,5%	41,2% / 10%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	56,3% / 26,3%	
Cucurbita maxima LOC111483960	C.m.2	100% / 98,8%	96,3% / 91,3%	95% / 91,3%	93,8% / 90%	97,5% / 93,8%	98,8% / 93,8%	97,5% / 96,3%	41,2% / 10%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	56,3% / 26,3%	
Momordica charantia LOC111794858	M.c.1	100% / 100%	96,3% / 92,5%	95% / 92,5%	93,8% / 90%	97,5% / 95%	98,8% / 93,8%	97,5% / 97,5%	41,2% / 10%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	56,3% / 26,3%	
Momordica charantia LOC111020632	M.c.2	100% / 100%	96,3% / 92,5%	95% / 92,5%	93,8% / 90%	97,5% / 95%	98,8% / 93,8%	97,5% / 97,5%	41,2% / 10%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	56,3% / 26,3%	
Citrus limon	C.l	100% / 100%	96,3% / 92,5%	95% / 91,3%	93,8% / 90%	97,5% / 95%	98,8% / 93,8%	97,5% / 96,3%	41,2% / 10%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	56,3% / 26,3%	
Cucumis melo DHL92	C.melo	100% / 98,8%	96,3% / 91,3%	95% / 91,3%	93,8% / 90%	97,5% / 93,8%	98,8% / 93,8%	97,5% / 96,3%	41,2% / 10%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	56,3% / 26,3%	
Cucurbita mochata	C.mo	100% / 98,8%	96,3% / 91,3%	95% / 91,3%	93,8% / 90%	97,5% / 93,8%	98,8% / 93,8%	97,5% / 96,3%	41,2% / 10%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	56,3% / 26,3%	
Cucumis sativus	C.sati	100% / 98,8%	96,3% / 91,3%	95% / 91,3%	93,8% / 90%	97,5% / 93,8%	98,8% / 93,8%	97,5% / 96,3%	41,2% / 10%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	56,3% / 26,3%	
Citrus clementina	C.c	100% / 100%	96,3% / 92,5%	95% / 92,5%	93,8% / 90%	97,5% / 95%	98,8% / 93,8%	97,5% / 97,5%	41,2% / 10%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	56,3% / 26,3%	
Nicotiana attenuata	N.a	96,3% / 92,5%	100% / 100%	98,8% / 97,5%	92,5% / 87,5%	95% / 93,8%	96,3% / 93,8%	96,3% / 91,3%	42,5% / 11,2%	28,7% / 5%	28,7% / 5%	57,5% / 25%	
Nicotiana tabacum	N.ta	95% / 92,5%	98,8% / 97,5%	100% / 100%	91,3% / 87,5%	93,8% / 93,8%	95% / 93,8%	95% / 91,3%	43,8% / 11,2%	30% / 6,3%	30% / 6,3%	58,8% / 26,3%	
Solanum lycopersicum 007170	S.l1	93,8% / 90%	92,5% / 87,5%	91,3% / 87,5%	100% / 100%	92,5% / 88,8%	93,8% / 88,8%	93,8% / 88,8%	42,5% / 12,5%	27,5% / 5%	27,5% / 5%	58,8% / 26,3%	
Solanum lycopersicum 067230	S.l2	97,5% / 95%	95% / 93,8%	93,8% / 93,8%	92,5% / 88,8%	100% / 100%	98,8% / 98,8%	96,3% / 93,8%	41,2% / 10%	30% / 5%	30% / 5%	56,3% / 25%	
Solanum lycopersicum 067240	S.l3	98,8% / 95%	96,3% / 93,8%	95% / 93,8%	93,8% / 88,8%	98,8% / 98,8%	100% / 100%	97,5% / 93,8%	41,2% / 10%	28,7% / 5%	28,7% / 5%	57,5% / 25%	
Vitis vinifera	V.v	97,5% / 97,5%	96,3% / 91,3%	95% / 91,3%	93,8% / 88,8%	96,3% / 93,8%	97,5% / 93,8%	100% / 100%	41,2% / 10%	27,5% / 3,8%	27,5% / 3,8%	57,5% / 26,3%	
Lokiarchaeota archaeon	La	41,2% / 10%	42,5% / 11,2%	43,8% / 11,2%	42,5% / 12,5%	41,2% / 10%	41,2% / 10%	41,2% / 10%	100% / 100%	27,5% / 8,7%	27,5% / 8,7%	40% / 5%	
Heimdallarchaeota archaeon	Ha	27,5% / 3,8%	28,7% / 5%	30% / 6,3%	27,5% / 5%	30% / 5%	28,7% / 5%	27,5% / 3,8%	27,5% / 8,7%	100% / 100%	100% / 100%	48,8% / 12,5%	
Homo sapiens VPS4a	H.sa	56,3% / 26,3%	57,5% / 25%	58,8% / 26,3%	58,8% / 26,3%	56,3% / 25%	57,5% / 25%	57,5% / 26,3%	40% / 5%	48,8% / 12,5%	48,8% / 12,5%	100% / 100%	
Homo sapiens VPS4b	H.s.b	33,8% / 5%	35% / 5%	36,2% / 5%	36,2% / 6,3%	36,2% / 5%	35% / 5%	35% / 5%	43,8% / 18,8%	37,5% / 7,5%	37,5% / 7,5%	36,2% / 8,7%	
Mustela erminea VPS4a	M.e.a	56,3% / 26,3%	57,5% / 25%	58,8% / 26,3%	58,8% / 26,3%	56,3% / 25%	57,5% / 25%	57,5% / 26,3%	40% / 5%	48,8% / 12,5%	48,8% / 12,5%	100% / 97,5%	
Mustela erminea VPS4b	M.e.b	33,8% / 5%	35% / 5%	36,2% / 5%	36,2% / 6,3%	36,2% / 5%	35% / 5%	35% / 5%	46,3% / 17,5%	35% / 7,5%	35% / 7,5%	36,2% / 10%	
Saccharomyces cerevisiae	S.c	31,3% / 3,8%	30% / 5%	28,7% / 5%	33,8% / 5%	33,8% / 5%	32,5% / 5%	31,3% / 3,8%	32,5% / 7,5%	73,8% / 27,5%	73,8% / 27,5%	52,5% / 25%	
Schizosaccharomyces pombe	S.p	35% / 6,3%	36,2% / 6,3%	35% / 6,3%	37,5% / 7,5%	37,5% / 6,3%	36,2% / 6,3%	35% / 6,3%	31,3% / 7,5%	71,3% / 25%	71,3% / 25%	56,3% / 26,3%	

Table S5 (2/3) : Table de comparaison des similarités/identités entre les domaines MIT de la protéine VPS4

Les niveaux de similarité et d'identité des protéines VPS4 de chaque espèce présent dans la table a été obtenu suite à l'alignement multiple du domaine MIT de la protéine VPS4.

		Similarity/Identity VPS4 MIT domain					
		H.sb	M.ea	M.eb	S.c	S.p	
Brassica oleracea var. oleracea	B.o	36,2% / 6,3%	58,8% / 26,3%	36,2% / 6,3%	32,5% / 5%	36,2% / 6,3%	
Arabidopsis thaliana	A.t	36,2% / 6,3%	58,8% / 26,3%	36,2% / 6,3%	32,5% / 5%	36,2% / 6,3%	
Cucurbita maxima LOC111490739	C.m 1	33,8% / 5%	56,3% / 26,3%	33,8% / 5%	31,3% / 3,8%	35% / 6,3%	
Cucurbita maxima LOC111483960	C.m 2	33,8% / 5%	56,3% / 26,3%	33,8% / 5%	31,3% / 3,8%	35% / 6,3%	
Momordica charantia LOC111794858	M.c 1	33,8% / 5%	56,3% / 26,3%	33,8% / 5%	31,3% / 3,8%	35% / 6,3%	
Momordica charantia LOC111020632	M.c 2	33,8% / 5%	56,3% / 26,3%	33,8% / 5%	31,3% / 3,8%	35% / 6,3%	
Citrus lanatus	C.l	33,8% / 5%	56,3% / 26,3%	33,8% / 5%	31,3% / 3,8%	35% / 6,3%	
Cucumis melo DHL92	C.melo	33,8% / 5%	56,3% / 26,3%	33,8% / 5%	31,3% / 3,8%	35% / 6,3%	
Cucurbita mochatata	C.mo	33,8% / 5%	56,3% / 26,3%	33,8% / 5%	31,3% / 3,8%	35% / 6,3%	
Cucumis sativus	C.sati	33,8% / 5%	56,3% / 26,3%	33,8% / 5%	31,3% / 3,8%	35% / 6,3%	
Citrus clementina	C.c	33,8% / 5%	56,3% / 26,3%	33,8% / 5%	31,3% / 3,8%	35% / 6,3%	
Nicotiana attenuata	N.a	35% / 5%	57,5% / 25%	35% / 5%	30% / 5%	36,2% / 6,3%	
Nicotiana tabacum	N.ta	36,2% / 5%	58,8% / 26,3%	36,2% / 5%	28,7% / 5%	35% / 6,3%	
Solanum lycopersicum 007170	S.l1	36,2% / 6,3%	58,8% / 26,3%	36,2% / 6,3%	33,8% / 5%	37,5% / 7,5%	
Solanum lycopersicum 067230	S.l2	36,2% / 5%	56,3% / 25%	36,2% / 5%	33,8% / 5%	37,5% / 6,3%	
Solanum lycopersicum 067240	S.l3	35% / 5%	57,5% / 25%	35% / 5%	32,5% / 5%	36,2% / 6,3%	
Vitis vinifera	V.v	35% / 5%	57,5% / 26,3%	35% / 5%	31,3% / 3,8%	35% / 6,3%	
Lokiarchaeota archaeon	L.a	43,8% / 18,8%	40% / 5%	46,3% / 17,5%	32,5% / 7,5%	31,3% / 7,5%	
Heimdallarchaeota archaeon	H.a	37,5% / 7,5%	48,8% / 12,5%	35% / 7,5%	73,8% / 27,5%	71,3% / 25%	
Homo sapiens VPS4a	H.sa	36,2% / 8,7%	100% / 97,5%	36,2% / 10%	52,5% / 25%	56,3% / 26,3%	
Homo sapiens VPS4b	H.sb	100% / 100%	36,2% / 8,7%	97,5% / 95%	37,5% / 8,7%	37,5% / 7,5%	
Mustela erminea VPS4a	M.ea	36,2% / 8,7%	100% / 100%	36,2% / 10%	52,5% / 23,8%	56,3% / 26,3%	
Mustela erminea VPS4b	M.eb	97,5% / 95%	36,2% / 10%	100% / 100%	36,2% / 7,5%	36,2% / 5%	
Saccharomyces cerevisiae	S.c	37,5% / 8,7%	52,5% / 23,8%	36,2% / 7,5%	100% / 100%	87,5% / 55%	
Schizosaccharomyces pombe	S.p	37,5% / 7,5%	56,3% / 26,3%	36,2% / 5%	87,5% / 55%	100% / 100%	

Table S5 (3/3) : Table de comparaison des similarités/identités entre les domaines MIT de la protéine VPS4

Les niveaux de similarité et d'identité des protéines VPS4 de chaque espèce présentent dans la table a été obtenu suite à l'alignement multiple du domaine MIT de la protéine VPS4.

		Similarity/identity VPS4 AAA-ATPase domain											
AAA-ATPase		B.o	A.t	C.m 1	C.m 2	M.c 1	M.c 2	C.l	C.melo	C.mo	C.sati		
Brassica oleracea var. oleracea		100% / 100%	98,3% / 95,9%	97,5% / 92,1%	97,9% / 92,1%	97,5% / 91,7%	97,5% / 90,5%	97,5% / 90,9%	97,5% / 90,9%	97,9% / 92,1%	97,1% / 90,9%		
Arabidopsis thaliana		98,3% / 95,9%	100% / 100%	98,8% / 92,9%	99,2% / 92,9%	98,8% / 91,7%	98,8% / 91,3%	98,8% / 91,7%	98,8% / 91,7%	99,2% / 92,9%	98,3% / 91,7%		
Cucurbita maxima LOC111490739		97,5% / 92,1%	98,8% / 92,9%	100% / 100%	99,6% / 97,9%	100% / 99,6%	99,6% / 97,9%	100% / 97,9%	100% / 97,9%	99,6% / 97,5%	99,6% / 97,5%		
Cucurbita maxima LOC111483960		97,9% / 92,1%	99,2% / 92,9%	99,6% / 97,5%	100% / 100%	99,6% / 97,9%	99,2% / 97,9%	99,6% / 98,8%	99,6% / 98,3%	100% / 100%	99,2% / 97,5%		
Momordica charantia LOC111794858		97,5% / 91,7%	98,8% / 92,5%	100% / 99,6%	99,6% / 97,9%	100% / 100%	99,6% / 98,3%	100% / 98,3%	100% / 97,9%	99,6% / 97,9%	99,6% / 97,9%		
Momordica charantia LOC111020632		97,5% / 90,5%	98,8% / 91,3%	99,6% / 97,9%	99,2% / 97,9%	99,6% / 98,3%	100% / 100%	99,6% / 99,2%	99,6% / 98,8%	99,2% / 97,9%	99,2% / 97,9%		
Citrullus lanatus		97,5% / 90,9%	98,8% / 91,7%	100% / 97,9%	99,6% / 98,8%	100% / 98,3%	99,6% / 99,2%	100% / 100%	100% / 99,6%	99,6% / 98,8%	99,6% / 98,8%		
Cucumis melo DHL92		97,5% / 90,9%	98,8% / 91,7%	100% / 97,5%	99,6% / 98,3%	100% / 97,9%	99,6% / 98,8%	100% / 99,6%	100% / 100%	99,6% / 98,3%	99,6% / 98,3%		
Cucurbita mochatata		97,9% / 92,1%	99,2% / 92,9%	99,6% / 97,5%	100% / 100%	99,6% / 97,9%	99,2% / 97,9%	99,6% / 98,8%	99,6% / 98,3%	100% / 100%	99,2% / 97,5%		
Cucumis sativus		97,1% / 90,9%	98,3% / 91,7%	99,6% / 97,5%	99,2% / 97,5%	99,6% / 97,9%	99,2% / 97,9%	99,6% / 98,8%	99,6% / 99,2%	99,6% / 99,2%	100% / 100%		
Citrus clementina		98,3% / 92,1%	98,3% / 92,1%	99,2% / 96,3%	98,8% / 94,6%	99,2% / 95,9%	99,2% / 95,4%	99,2% / 95,9%	99,2% / 95,4%	98,8% / 94,6%	98,8% / 94,6%		
Nicotiana attenuata		97,9% / 92,5%	97,9% / 92,1%	98,8% / 93,8%	98,3% / 92,5%	98,8% / 93,4%	98,8% / 93,4%	98,8% / 93,8%	98,8% / 93,8%	98,3% / 92,5%	98,3% / 92,5%		
Nicotiana tabacum		97,9% / 92,5%	97,9% / 92,1%	98,8% / 93,8%	98,3% / 92,5%	98,8% / 93,4%	98,8% / 93,4%	98,8% / 93,8%	98,8% / 93,8%	98,3% / 92,5%	98,3% / 92,5%		
Solanum lycopersicum 007170		97,9% / 91,7%	97,1% / 90%	97,9% / 92,5%	97,5% / 91,7%	97,9% / 92,1%	97,9% / 92,5%	97,9% / 92,9%	97,9% / 92,9%	97,5% / 91,7%	97,5% / 91,7%		
Solanum lycopersicum 067230		97,1% / 91,7%	97,5% / 91,7%	98,3% / 93,4%	97,9% / 92,1%	98,3% / 92,9%	98,8% / 92,1%	98,3% / 92,5%	98,3% / 92,5%	98,3% / 92,5%	97,9% / 92,9%		
Solanum lycopersicum 067240		97,5% / 92,5%	97,5% / 92,1%	98,3% / 93,8%	97,9% / 92,5%	98,3% / 93,4%	98,3% / 92,5%	98,3% / 92,9%	98,3% / 92,9%	97,9% / 92,5%	97,9% / 92,5%		
Vitis vinifera		96,7% / 91,3%	97,5% / 92,5%	98,3% / 94,2%	97,9% / 93,4%	98,3% / 93,8%	98,3% / 94,2%	98,3% / 94,6%	98,3% / 94,2%	97,9% / 93,4%	97,9% / 93,4%		
Lokiarchaeota archaeon		83,3% / 50,6%	82,8% / 50,6%	83,7% / 51,9%	83,3% / 51,5%	83,7% / 51,5%	83,7% / 52,3%	83,7% / 52,3%	83,7% / 52,3%	83,3% / 51,5%	83,3% / 51,9%		
Heimdallarchaeota archaeon		80,1% / 47,5%	79,2% / 47,1%	79,2% / 48%	78,7% / 47,5%	79,2% / 47,5%	79,2% / 48%	79,2% / 48%	79,2% / 48%	78,7% / 47,5%	78,7% / 48%		
Homo sapiens VPS4a		90,4% / 69,9%	90,4% / 70,7%	91,2% / 71,1%	91,2% / 70,3%	91,2% / 70,7%	90,8% / 70,3%	91,2% / 70,3%	91,2% / 70,3%	91,2% / 70,3%	90,8% / 70,3%		
Homo sapiens VPS4b		90,4% / 71,7%	90% / 71,3%	90,8% / 71,7%	90,8% / 71,3%	90,8% / 72,1%	90,4% / 71,7%	90,8% / 72,1%	90,8% / 72,1%	90,8% / 71,3%	90,4% / 72,1%		
Mustela erminea VPS4a		90,4% / 70,3%	90,4% / 71,1%	91,2% / 71,5%	91,2% / 70,7%	91,2% / 71,1%	90,8% / 70,7%	91,2% / 70,7%	91,2% / 70,7%	91,2% / 70,7%	90,8% / 70,7%		
Mustela erminea VPS4b		91,3% / 72,1%	90,4% / 71,7%	90,4% / 70,8%	90,8% / 70,8%	90,4% / 71,3%	90,4% / 71,3%	90,4% / 71,3%	90,4% / 71,3%	90,8% / 70,8%	90,8% / 70,8%		
Saccharomyces cerevisiae		90,8% / 69,9%	89,5% / 70,3%	90,4% / 70,7%	90% / 69,5%	90,4% / 70,3%	90,4% / 70,7%	90,4% / 70,3%	90,4% / 70,3%	90,4% / 69,5%	90% / 70,3%		
Schizosaccharomyces pombe		91,3% / 66,7%	90,8% / 66,2%	90,8% / 66,2%	91,3% / 67,5%	90,8% / 66,7%	90,8% / 67,1%	90,8% / 67,1%	90,8% / 67,1%	91,3% / 67,5%	90,4% / 67,1%		

Table S6 (1/3) : Table de comparaison des similarités/identités entre les domaines AAA-ATPase de la protéine VPS4

Les niveaux de similarité et d'identité des protéines VPS4 de chaque espèce présentent dans la table a été obtenu suite à l'alignement multiple du domaine AAA-ATPase de la protéine VPS4.

		Similarity/Identity VPS4 AAA-ATPase domain										
		C.c	N.a	N.ta	S.I1	S.I2	S.I3	V.v	La	H.a	H.sa	
Brassica oleracea var. oleracea	B.o	98,3% / 92,1%	97,9% / 92,5%	97,9% / 92,5%	97,9% / 91,7%	97,1% / 91,7%	97,5% / 92,5%	96,7% / 91,3%	83,3% / 50,6%	80,1% / 47,5%	90,4% / 69,9%	
Arabidopsis thaliana	A.t	98,3% / 92,1%	97,9% / 92,1%	97,9% / 92,1%	97,1% / 90%	97,5% / 91,7%	97,5% / 92,1%	97,5% / 92,5%	82,8% / 50,6%	79,2% / 47,1%	90,4% / 70,7%	
Cucurbita maxima LOC111490739	C.m.1	99,2% / 96,3%	98,8% / 93,8%	98,8% / 93,8%	97,9% / 92,5%	98,3% / 93,4%	98,3% / 93,8%	98,3% / 94,2%	83,7% / 51,9%	79,2% / 48%	91,2% / 71,1%	
Cucurbita maxima LOC111483960	C.m.2	98,8% / 94,6%	98,3% / 92,5%	98,3% / 92,5%	97,5% / 91,7%	97,9% / 92,1%	97,9% / 92,5%	97,9% / 93,4%	83,3% / 51,5%	78,7% / 47,5%	91,2% / 70,3%	
Momordica charantia LOC111794858	M.c.1	99,2% / 95,9%	98,8% / 93,4%	98,8% / 93,4%	97,9% / 92,1%	98,3% / 92,9%	98,3% / 93,4%	98,3% / 93,8%	83,7% / 51,5%	79,2% / 47,5%	91,2% / 70,7%	
Momordica charantia LOC111020632	M.c.2	99,2% / 95,4%	98,8% / 93,4%	98,8% / 93,4%	97,9% / 92,5%	98,8% / 92,1%	98,3% / 92,5%	98,3% / 94,2%	83,7% / 52,3%	79,2% / 48%	90,8% / 70,3%	
Citrus lanatus	C.l	99,2% / 95,9%	98,8% / 93,8%	98,8% / 93,8%	97,9% / 92,9%	98,3% / 92,5%	98,3% / 92,9%	98,3% / 94,6%	83,7% / 52,3%	79,2% / 48%	91,2% / 70,3%	
Cucurbita melo DHL92	C.melo	99,2% / 95,4%	98,8% / 93,8%	98,8% / 93,8%	97,9% / 92,9%	98,3% / 92,5%	98,3% / 92,9%	98,3% / 94,2%	83,7% / 52,3%	79,2% / 48%	91,2% / 70,3%	
Cucurbita mochata	C.mo	98,8% / 94,6%	98,3% / 92,5%	98,3% / 92,5%	97,5% / 91,7%	97,9% / 92,1%	97,9% / 92,5%	97,9% / 93,4%	83,3% / 51,5%	78,7% / 47,5%	91,2% / 70,3%	
Cucumis sativus	C.sati	98,8% / 95,4%	98,3% / 94,2%	98,3% / 94,2%	97,5% / 92,9%	97,9% / 92,9%	97,9% / 93,4%	97,9% / 94,6%	83,3% / 51,9%	78,7% / 48%	90,8% / 70,3%	
Citrus clementina	C.c	100% / 100%	99,6% / 95,9%	99,6% / 95,9%	98,8% / 93,8%	98,8% / 94,2%	99,2% / 95%	98,3% / 95,4%	84,1% / 52,7%	80,1% / 49,3%	90,8% / 70,7%	
Nicotiana attenuata	N.a	99,6% / 95,9%	100% / 100%	100% / 100%	98,3% / 93,8%	99,2% / 97,9%	99,6% / 98,3%	97,9% / 94,6%	84,5% / 53,1%	80,5% / 49,8%	91,2% / 70,7%	
Nicotiana tabacum	N.ta	99,6% / 95,9%	100% / 100%	100% / 100%	98,3% / 93,8%	99,2% / 97,9%	99,6% / 98,3%	97,9% / 94,6%	84,5% / 53,1%	80,5% / 49,8%	91,2% / 70,7%	
Solanum lycopersicum 007170	S.l1	98,8% / 93,8%	98,3% / 93,8%	98,3% / 93,8%	100% / 100%	98,3% / 93,4%	98,8% / 94,2%	97,1% / 92,5%	83,8% / 52,5%	81,1% / 50%	91,6% / 70,7%	
Solanum lycopersicum 067230	S.l2	98,8% / 94,2%	99,2% / 97,9%	99,2% / 97,9%	98,3% / 93,4%	100% / 100%	99,6% / 98,8%	97,1% / 92,9%	84,5% / 52,3%	80,5% / 49,8%	91,2% / 70,3%	
Solanum lycopersicum 067240	S.l3	99,2% / 95%	99,6% / 98,3%	99,6% / 98,3%	98,8% / 94,2%	99,6% / 98,8%	100% / 100%	97,5% / 93,8%	84,9% / 52,7%	81% / 49,3%	91,2% / 70,3%	
Vitis vinifera	V.v	98,3% / 95,4%	97,9% / 94,6%	97,9% / 94,6%	97,1% / 92,5%	97,1% / 92,9%	97,5% / 93,8%	100% / 100%	83,7% / 51,9%	80,1% / 49,3%	90,4% / 69,5%	
Lokiarchaeota archaeon	La	84,1% / 52,7%	84,5% / 53,1%	84,5% / 53,1%	83,8% / 52,5%	84,5% / 52,3%	84,9% / 52,7%	83,7% / 51,9%	100% / 100%	83,2% / 57,3%	78,9% / 51,9%	
Heimdallarchaeota archaeon	Ha	80,1% / 49,3%	80,5% / 49,8%	80,5% / 49,8%	81,1% / 50%	80,5% / 49,8%	81% / 49,3%	80,1% / 49,3%	83,2% / 57,3%	100% / 100%	78,2% / 51,4%	
Homo sapiens VPS4a	H.sa	90,8% / 70,7%	91,2% / 70,7%	91,2% / 70,7%	91,6% / 70,7%	91,2% / 70,3%	91,2% / 70,3%	90,4% / 69,5%	78,9% / 51,9%	78,2% / 51,4%	100% / 100%	
Homo sapiens VPS4b	H.sb	90,8% / 72,1%	91,3% / 71,3%	91,3% / 71,3%	91,7% / 72,1%	91,3% / 70,8%	91,3% / 70,8%	90% / 70,8%	80,3% / 52,9%	80% / 51,4%	96,7% / 87,5%	
Mustela erminea VPS4a	M.ea	90,8% / 71,1%	91,2% / 71,1%	91,2% / 71,1%	91,6% / 71,1%	91,2% / 70,7%	91,2% / 70,7%	90,4% / 69,9%	78,9% / 51,9%	78,2% / 50,9%	100% / 99,6%	
Mustela erminea VPS4b	M.eb	91,3% / 71,7%	91,7% / 70,8%	91,7% / 70,8%	92,1% / 71,7%	91,3% / 70,4%	91,7% / 70,4%	90,4% / 70,8%	80,7% / 52,9%	80,5% / 51,8%	96,3% / 86,7%	
Saccharomyces cerevisiae	S.c	91,2% / 72%	91,6% / 71,1%	91,6% / 71,1%	92,5% / 71,1%	91,6% / 70,7%	92,1% / 70,7%	90,4% / 71,5%	80,3% / 52,1%	83,1% / 56,2%	91,6% / 74,4%	
Schizosaccharomyces_pombe	S.p	91,3% / 67,1%	91,7% / 65,8%	91,7% / 65,8%	92,5% / 66,7%	91,7% / 65,4%	92,1% / 65,4%	90% / 65,4%	81,1% / 51,7%	80,5% / 51,4%	92,5% / 72%	

Table S6 (2/3) : Table de comparaison des similarités/identités entre les domaines AAA-ATPase de la protéine VPS4
 Les niveaux de similarité et d'identité des protéines VPS4 de chaque espèce présentent dans la table a été obtenu suite à l'alignement multiple du domaine AAA-ATPase de la protéine VPS4.

Similarity/Identity VPS4 AAA-ATPase domain						
	H.sb	M. ea	M. eb	S. c	S. p	
Brassica oleracea var. oleracea	B.o	90,4% / 71,7%	90,4% / 70,3%	91,3% / 72,1%	90,8% / 69,9%	91,3% / 66,7%
Arabidopsis thaliana	A.t	90% / 71,3%	90,4% / 71,1%	90,4% / 71,7%	89,5% / 70,3%	90,8% / 66,2%
Cucurbita maxima LOC111490739	C.m 1	90,8% / 71,7%	91,2% / 71,5%	90,4% / 70,8%	90,4% / 70,7%	90,8% / 66,2%
Cucurbita maxima LOC111483960	C.m 2	90,8% / 71,3%	91,2% / 70,7%	90,8% / 70,8%	90% / 69,5%	91,3% / 67,5%
Momordica charantia LOC111794858	M.c 1	90,8% / 72,1%	91,2% / 71,1%	90,4% / 71,3%	90,4% / 70,3%	90,8% / 66,7%
Momordica charantia LOC111020632	M.c 2	90,4% / 71,7%	90,8% / 70,7%	90,4% / 71,3%	90,4% / 70,7%	90,8% / 67,1%
Citrullus lanatus	C.l	90,8% / 72,1%	91,2% / 70,7%	90,4% / 71,3%	90,4% / 70,3%	90,8% / 67,1%
Cucumis melo DHL92	C.melo	90,8% / 72,1%	91,2% / 70,7%	90,4% / 71,3%	90,4% / 70,3%	90,8% / 67,1%
Cucurbita mochata	C.mo	90,8% / 71,3%	91,2% / 70,7%	90,8% / 70,8%	90% / 69,5%	91,3% / 67,5%
Cucumis sativus	C.sati	90,4% / 72,1%	90,8% / 70,7%	90% / 71,3%	90% / 70,3%	90,4% / 67,1%
Citrus dementina	C.c	90,8% / 72,1%	90,8% / 71,1%	91,3% / 71,7%	91,2% / 72%	91,3% / 67,1%
Nicotiana attenuata	N.a	91,3% / 71,3%	91,2% / 71,1%	91,7% / 70,8%	91,6% / 71,1%	91,7% / 65,8%
Nicotiana tabacum	N.ta	91,3% / 71,3%	91,2% / 71,1%	91,7% / 70,8%	91,6% / 71,1%	91,7% / 65,8%
Solanum lycopersicum 007170	S.l1	91,7% / 72,1%	91,6% / 71,1%	92,1% / 71,7%	92,5% / 71,1%	92,5% / 66,7%
Solanum lycopersicum 067230	S.l2	91,3% / 70,8%	91,2% / 70,7%	91,3% / 70,4%	91,6% / 70,7%	91,7% / 65,4%
Solanum lycopersicum 067240	S.l3	91,3% / 70,8%	91,2% / 70,7%	91,7% / 70,4%	92,1% / 70,7%	92,1% / 65,4%
Vitis vinifera	V.v	90% / 70,8%	90,4% / 69,9%	90,4% / 70,8%	90,4% / 71,5%	90% / 65,4%
Lokiarchaeota archaeon	La	80,3% / 52,9%	78,9% / 51,9%	80,7% / 52,9%	80,3% / 52,1%	81,1% / 51,7%
Heimdallarchaeota archaeon	Ha	80% / 51,4%	78,2% / 50,9%	80,5% / 51,8%	83,1% / 56,2%	80,5% / 51,4%
Homo sapiens VPS4a	H.sa	96,7% / 87,5%	100% / 99,6%	96,3% / 86,7%	91,6% / 74,4%	92,5% / 72%
Homo sapiens VPS4b	H.sb	100% / 100%	96,7% / 87,9%	99,2% / 98,8%	91,2% / 75,7%	92,1% / 75%
Mustela erminea VPS4a	M. ea	96,7% / 87,9%	100% / 100%	96,3% / 87,1%	91,6% / 74,4%	92,5% / 72%
Mustela erminea VPS4b	M. eb	99,2% / 98,8%	96,3% / 87,1%	100% / 100%	91,6% / 75,7%	92,9% / 75,8%
Saccharomyces cerevisiae	S.c	91,2% / 75,7%	91,6% / 74,4%	91,6% / 75,7%	100% / 100%	91,6% / 74,9%
Schizosaccharomyces pombe	S.p	92,1% / 75%	92,5% / 72%	92,9% / 75,8%	91,6% / 74,9%	100% / 100%

Table S6 (3/3) : Table de comparaison des similarités/identités entre les domaines AAA ATPase de la protéine VPS4

Les niveaux de similarité et d'identité des protéines VPS4 de chaque espèce présentent dans la table a été obtenu suite à l'alignement multiple du domaine AAA-ATPase de la protéine VPS4.

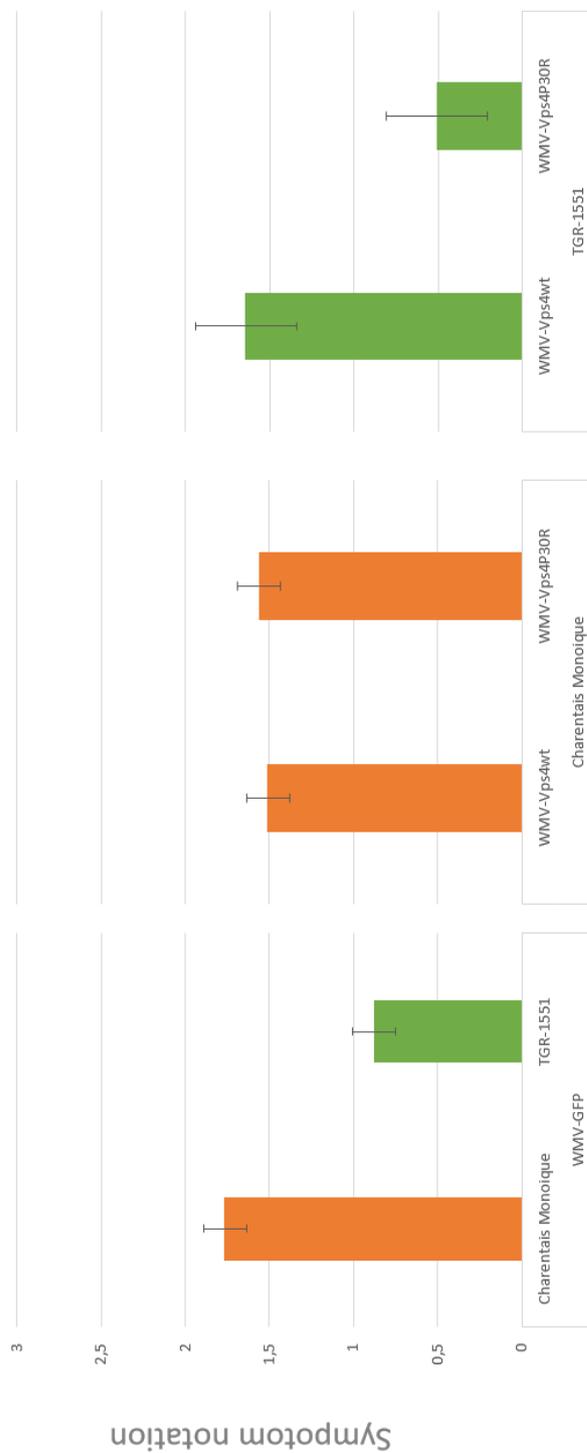


Figure S1 : Symptômes présentés après infection par des souches du WMV transformées chez les accessions de melon Charentais Monoïque et TGR-1551

Notation des symptômes de WMV-LLA1, WMV-Vps4wt et WMV-Vps4P30R sur les accessions Charentais monoïque et TGR-1551 (n ≥ 6) à 20 jour après inoculation (dpi). La notation moyenne sur une échelle de 0 à 3 est représentée

	CmVps2,1	CmVps2,2	CmVps2,3
<i>CmVps2,1</i>	x	x	x
<i>CmVps2,2</i>	92,8%/83,9%	x	x
<i>CmVps2,3</i>	61,9%/41,7%	62,3%41,7%	x

Table S7 : Table de comparaison des similarités/identités entre les protéines VPS2 du melon

Les niveaux de similarité et d'identité des protéines VPS2 identifiées dans le génome du melon et présentées dans la table ont été obtenus suite à l'alignement multiple des protéines VPS2.

